

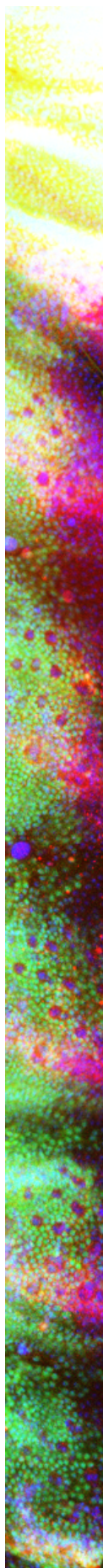
Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Análisis funcional de la proteína
Abdominal-B y de los genes
extradenticle y *homothorax* en
*Drosophila melanogaster***

Memoria presentada por
Jesús Rodríguez Curt
para optar al grado de Doctor en Ciencias por
la Universidad Autónoma de Madrid
Junio de 2015

Director de Tesis:
Ernesto Sánchez-Herrero Arbide

A mis sobrinos, Miguel y Tomás



ÍNDICE

Índice

Summary/ Resumen	17
------------------	----

1. Introducción

1.1 El origen de la vida y la Biología del Desarrollo	21
1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	21
1.3 Ciclo vital de <i>D. melanogaster</i>	23
1.4 Embriogénesis de <i>D. melanogaster</i>	23
1.4.1. Embriogénesis temprana: la segmentación	23
1.4.2 Genes Homeóticos (genes Hox)	24
1.5 Procesos de desarrollo tardíos: los discos imaginales y los nidos de histoblastos	
1.5.1 Introducción	24
1.5.2 Los discos imaginales	24
1.5.3 Desarrollo del abdomen	27
1.5.4 <i>Abdominal-B</i>	29
1.5.5 Especificación sexual	30
1.5.6 Regulación de la pigmentación en el abdomen	31
1.5.7 Morfología del A7: represión en machos y reducción en hembras	31
1.5.7.1 Introducción	31
1.5.7.2 Reducción del tamaño del segmento séptimo abdominal	32
1.5.7.3 Eliminación del segmento séptimo abdominal en machos	32
1.6 Especificidad de las proteínas Hox	33
1.6.1 Introducción	33
1.6.2 Unión al DNA: unión monomérica	34
1.6.3 Los cofactores Extradenticle y Homothorax	34
1.6.4 Unión al DNA: unión heteromérica	34
1.6.5 Interacciones Hox-Extradenticle fuera del HX	37
1.6.6 <i>Abdominal-B</i> y su relación con Homothorax y Extradenticle	37
1.6.7 Otros cofactores de proteínas Hox	39

2. Objetivos	43
--------------	----

3. Materiales y Métodos

3.1 Estirpes de moscas mutantes o transgénicas	47
3.2 Expresión ectópica de genes	47
3.2.1 Líneas Gal4	47
3.2.2 Líneas UAS	49
3.3 Análisis clonal	49
3.4 Cuantificación de los niveles de expresión de las líneas UAS-Abd-B	49
3.5 Análisis de las cutículas adultas	50
3.6 Análisis de las cutículas embrionarias	50
3.7 Técnicas inmunohistoquímicas	50
3.7.1 Anticuerpos primarios	51
3.7.2 Anticuerpos secundarios	52
3.7.3 Microscopía confocal	52
3.7.4 Cuantificación de los niveles de expresión de Abd-B y Hth	52
3.8 Complementación de Bifluorescencia	52
3.9 Co-inmunoprecipitación	52

4. Resultados

I. ANÁLISIS FUNCIONAL DE DOMINIOS DE LA PROTEÍNA ABDOMINAL-B

4.1.1 Introducción	57
4.1.2 Represión de <i>Q-vg^{lacZ}</i>	59
4.1.3 Rescate del fenotipo Abdominal-B mutante en el segmento séptimo abdominal (A7)	60
4.1.3.1 Introducción	60
4.1.3.2 Método de las substituciones funcionales	60
4.1.3.3 Fenotipos silvestre y mutante 761-Gal4/ Abd-B ^{M1}	61
4.1.3.4 Rescate del fenotipo mutante al expresar Abd-B	62
4.1.3.5 Efecto de las variantes de Abd-B en la morfogénesis del séptimo segmento abdominal	62
4.1.3.5.1 Región del Hexapéptido (HX)	62
4.1.3.5.2 Región del "linker"	63
4.1.3.5.3 Región del brazo N-terminal del homeodominio	63
4.1.3.5.4 Hélice III del homeodominio	63
4.1.3.5.5 Región C-terminal adyacente al homeodominio	63
4.1.3.5.6 Intercambios de homeodominio con Ubx y Abd-A	63

4.1.4 Reemplazamientos funcionales en el A8 (genitalia femenina)

4.1.4.1 Introducción	65
4.1.4.2 Morfología silvestre de la genitalia femenina	65
4.1.4.3 Fenotipos silvestre y mutante Abd-B-Gal4 ^{LDN} /Abd-B ^{M1}	65
4.1.4.4 Rescate del fenotipo mutante al expresar Abd-B	65
4.1.4.5 Rescates del fenotipo mutante de la genitalia femenina con diferentes proteínas Abd-B	65
4.1.4.5.1 Región del Hexapéptido (HX)	65
4.1.4.5.2 Región del "linker"	66
4.1.4.5.3 Región del brazo N-terminal del homeodominio	66
4.1.4.5.4 Hélice III del homeodominio	66
4.1.4.5.5 Región C-terminal adyacente al homeodominio	66
4.1.4.5.6 Intercambios de homeodominio con Ubx y Abd-A	66

4.1.5 Expresión ectópica de las variantes de la proteínas Abd-B en el embrión

4.1.5.1 Morfología de la cutícula embrionaria	67
4.1.5.2 Efectos de la expresión ectópica de Abdominal-B en el embrión	68
4.1.5.3 Efecto de la expresión ectópica de las varinates de la proteína Abd-B en el desarrollo del embrión	69
4.1.5.3.1 Región del Hexapéptido (HX)	70
4.1.5.3.2 Región del "linker"	71
4.1.5.3.3 Región del brazo N-terminal del homeodominio	71
4.1.5.3.4 Hélice III del homeodominio	71
4.1.5.3.5 Región C-terminal adyacente al homeodominio	71
4.1.5.3.6 Intercambios de homeodominio con Ubx y Ab-A	71

II. PAPEL DE HTH Y EXD EN LA MORFOGÉNESIS DEL ABDOMEN POSTERIOR Y LA GENITALIA FEMENINA, Y SU RELACIÓN CON ABD-B

4.II.1 Introducción	73
4.II.2 Patrón de expresión de <i>exd</i> y <i>hth</i> en el abdomen pupal	73
4.II.2.1 Diferencias en la expresión de <i>hth</i> entre el T6 y el T7 de machos	73
4.II.2.2 Diferencias en la expresión de <i>hth</i> entre las hembras y los machos	73
4.II.3 Requerimiento mutuo de <i>Exd</i> y <i>Hth</i>	73
4.II.4 Requerimiento de <i>exd</i> y <i>hth</i> para la morfogénesis del A7	75
4.II.5 Regulación de <i>exd</i> y <i>hth</i> en el abdomen posterior	78

4.II.5.1 Introducción	78
4.II.5.2 Regulación de la expresión de <i>hth</i> por <i>Abd-B</i>	79
4.II.5.3 Regulación de la expresión de <i>Abd-B</i> por <i>hth</i>	81
4.II.6 Regulación de dianas controladas por <i>Abd-B</i> en el segmento A7	84
4.II.6.1 Regulación de <i>wg</i>	84
4.II.6.2 Regulación de <i>bab</i>	85
4.II.7 Requerimiento de <i>exd</i> y <i>hth</i> en la genitalia de la hembra	87
4.II.7.1 Morfología de la genitalia de la hembra en el genotipo silvestre	87
4.II.7.2 Fenotipo de <i>Abd-BGal4^{LDN}/Abd-B^{M1}</i> en la genitalia femenina	87
4.II.7.3 Requerimiento de <i>hth</i> y <i>exd</i> en la genitalia femenina	87
4.II.7.4 Interacciones entre <i>exd</i> y <i>Abd-B</i>	89
4.II.7.5 Expresiones de <i>sc</i> y <i>hth</i> en el disco genital	90

III. INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA ENTRE ABD-B Y EXD/HTH

4.III.1 Introducción	90
4.III.2 Complementación Bimolecular de Fluorescencia	91
4.III.3 Análisis de las interacciones entre <i>Abd-B</i> , <i>Exd</i> y <i>Hth</i> por coinmunoprecipitación	91
4.III.3.1 Efectos de mutaciones en la proteína <i>Abd-B</i> sobre la unión a <i>Exd</i>	92

5. Discusión

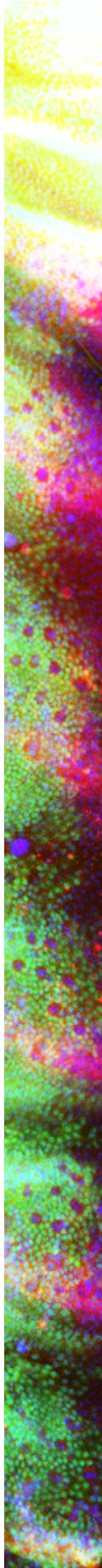
5.1 Función de los diferentes dominios de la proteína *Abd-B*

5.1.1 Introducción	97
5.1.2 Región del Hexapéptido y del "linker"	98
5.1.3 Brazo N-terminal del homeodominio	100
5.1.4 Hélice III del homeodominio	101
5.1.5 Región C-terminal adyacente al homeodominio	101
5.1.6 Intercambios de homeodominio	102

5.2 Función de *extradenticle* y *homothorax* en relación a *Abdominal-B*

5.2.1 Interacción de <i>Abd-B</i> y <i>Exd</i> a través del HX	103
5.2.2 Regulación entre <i>Abd-B</i> , <i>exd</i> y <i>hth</i>	103
5.2.3 Función de <i>exd</i> y <i>hth</i> en el abdomen posterior	105
5.2.4 Regulación de genes diana de <i>Abd-B</i> en el A7	106

5.2.5 Función de Exd y Hth en el desarrollo del A8 (Genitalia femenina)	107
5.2.6 Requerimiento mutuo de Exd y Hth	108
6. Conclusiones	111
7. Referencias	115
8. Agradecimientos	128



SUMMARY/ RESUMEN

Summary

The Hox gene *Abdominal-B* (*Abd-B*) specifies the posterior abdomen and genitalia of *Drosophila melanogaster*. Hox proteins bind DNA with a conserved domain known as the homeodomain, and have low specificity *in vitro*, with a short 4 base pair binding site, but high one *in vivo*. The classical explanation of such paradox is that the Hox proteins associate with cofactors, Extradenticle (Exd) and Homothorax (Hth) being those well characterized. Exd binds to Hox proteins by a particular motif, the Hexapeptide (HX), but Abd-B and its vertebrate paralogs have a degenerated HX with only one tryptophan (W) residue conserved. Apart from the HX region and the homeodomain, other conserved motifs have been described in Hox proteins, what opens the possibility that these may account for the specificity. The role of these motifs and the relationship between Exd/Hth and Abd-B has not been studied before in tissues in which the three proteins are present together.

In the first part of this thesis, we have analyzed the role of different motifs in the Abd-B protein in the development of four characters: repression of *Q-vg^{lacZ}*, posterior spiracle development, formation of female genitalia and suppression of the male seventh abdominal segment, the last three unique to Abd-B function, by mutating conserved aminoacids or domains and by exchanging part of the Abd-B protein with those of the Hox protein Ultrabithorax. Our results show that different parts of the protein are required for different characters. Some of the mutant proteins, like that mutated in the conserved W, are more active than the native one. This W is also needed to interact with Exd *in vitro*. It is also shown that the N-terminal region of the homeodomain and the C-terminal part of the protein are required to confer Abd-B specificity to some characters, and that the repression of *Q-vg^{lacZ}* is obtained even mutating aminoacids that bind DNA.

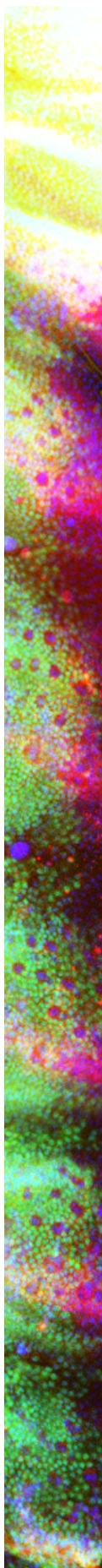
In the second part, we studied the role of *exd* and *hth* in the development of the abdominal seventh segment and female genitalia. In males, this abdominal segment is eliminated during pupation. Abd-B represses *hth* in both sexes, but in the male A7 this effect is bypassed by *hth* activation by the sex determination pathway effector DoublesexMale (DsxM). The regulation between *hth* and *Abd-B* may be further complicated by the autorepression of the latter, and by the inactivation of the Abd-B protein by Exd/Hth a function which also occurs in the primordium of the female genitalia. The sexual differences are also observed in the adult phenotypes, where the absence of *exd* or *hth* induces a small seventh segment in males and reduces the female one. Finally, we show that *exd* and *hth* also regulate two well-known targets of *Abd-B*, *wingless* and *bric-à-brac*, the former independently of the Hox protein. We propose models of how the relationship between Abd-B and Exd/Hth can bring out the development of the posterior part of the fly.

Resumen

Abdominal-B (Abd-B) es el gen Hox que especifica la región posterior del abdomen y la genitalia de *Drosophila melanogaster*. Las proteínas Hox se unen al ADN mediante un dominio conservado llamado homeodominio, y tienen una baja especificidad *in vitro*, con un sitio de unión de solo 4 pares de bases nucleotídicas (pb), pero una alta especificidad *in vivo*. La explicación clásica de esta paradoja ha sido que las proteínas Hox se asocian con los cofactores Extradenticle (Exd) y Homothorax (Hth), siendo esta relación bien conocida. Exd se une a las proteínas Hox por el motivo Hexapéptido (HX), pero Abd-B y sus parálogos en vertebrados tienen el motivo degenerado, conservando únicamente su triptófano (W) central. Además del motivo HX y el homeodominio, en las proteínas Hox han sido descritos otros motivos conservados, lo cual abre la posibilidad de que puedan ser relevantes para la especificidad. El papel de dichos motivos y la relación entre Exd/Hth y Abd-B no han sido estudiados en tejidos en los que las tres proteínas se expresan conjuntamente.

En la primera parte de esta tesis, hemos analizado el papel de diferentes motivos de la proteína Abd-B en el desarrollo de cuatro caracteres: la represión de $Q\text{-}vg^{lacZ}$, el desarrollo de los espiráculos posteriores, la formación de la genitalia femenina, y la represión del séptimo segmento abdominal de los machos, de los cuales los tres últimos son específicos de Abd-B, mediante la mutación de motivos o dominios, y también mediante su intercambio con los que presenta la proteína Hox Ultrabithorax. Nuestros resultados muestran que diferentes regiones de la proteína se requieren para la especificación de diferentes caracteres. Algunas de las proteínas mutantes, como la que es mutada en el W conservado, aumentan su actividad. Este aminoácido también se requiere para interactuar con Exd *in vitro*. También hemos encontrado que el brazo N-terminal del homeodominio, y la región C-terminal de la proteína se requieren para proporcionar especificidad sobre algunos caracteres, y que Abd-B puede reprimir a $Q\text{-}vg^{lacZ}$ cuando se mutan aminoácidos que se unen al DNA.

En la segunda parte, hemos estudiado el papel de *exd* y *hth* en el desarrollo del séptimo segmento abdominal y la genitalia hembra. En machos, este segmento es eliminado durante la pupación. *Abd-B* reprime a *hth* en ambos sexos, pero en el A7 de machos este efecto se ve contrarrestado por la activación de *hth* por el efector de la vía de determinación sexual, Doublesex-Male (DsxM). La regulación entre *hth* y *Abd-B* se complica debido a la auto represión de este último, y por la inactivación de la proteína Abd-B por Hth y Exd, la cual también ocurre en la genitalia femenina. Las diferencias sexuales también se observan en el fenotipo adulto, en donde la ausencia de *exd* u *hth* induce la formación de un pequeño séptimo segmento en machos y reduce el de hembras. Finalmente, mostramos que *exd* y *hth* también regulan dianas bien conocidas de *Abd-B*, *wingless* y *bric-à-brac*, la primera de manera independiente a las proteínas Hox. Proponemos modelos de como Abd-B y Exd/Hth contribuyen al desarrollo de la región posterior de la mosca de la fruta.



Introducción

1. Introducción

1.1 El origen de la vida y la Biología del Desarrollo

Hace 4500 millones de años se produjo un fenómeno maravilloso: por azar, se encerró en una bicapa lipídica un caldo rico en macromoléculas con capacidad autoreplicativa. Actualmente todas las formas de vida son descendientes de aquellos corpúsculos, que han dado lugar a las células. Desde entonces, los seres vivos han conseguido evitar la segunda ley de la termodinámica, que indica que deberían desorganizarse hasta alcanzar el equilibrio con el entorno. Los seres vivos responden a estímulos, se adaptan al medio y mantienen su homeostasis interna. Además, a lo largo de muchas generaciones, son capaces de evolucionar, permitiendo la adaptación a un entorno cambiante, en gran medida debido al efecto de los seres vivos. Por ejemplo, todo el gas oxígeno de nuestra atmósfera es un subproducto de la fotosíntesis realizada por las algas y plantas, y, según fue aumentando su concentración, se fueron desarrollando vías metabólicas que lo aprovechaban para obtener energía oxidando materia orgánica de otros seres vivos. Los fenómenos de mutación, selección natural, endosimbiosis, y transmisión génica horizontal, han contribuido al proceso de la evolución. Uno de los pasos clave en la evolución fue la aparición de la multicelularidad. Aunque en principio tal proceso disminuía la superficie de contacto del organismo con el medio, dificultando la captación de alimento, proporcionaba la posibilidad de la especialización celular. Un tipo de célula, los gametos, se especializaron en la reproducción, recapitulando en su código genético las instrucciones para replicarse no solo a ellas mismas, sino para generar toda una plétora de tipos celulares, tejidos, órganos, y morfologías. Por lo tanto, no toda la información es utilizada por todas las células, sino que hay un código que marca qué genes deben transcribirse y cuáles no en cada momento del desarrollo del organismo. El proceso del crecimiento y diferenciación del embrión es el objeto de estudio de la Biología del Desarrollo. Esta rama de la Biología utiliza herramientas como la Biología Molecular y Celular, la Genética, la Biofísica y otras, para estudiar los fenómenos que influyen principalmente en el desarrollo: redes de regulación génica, proliferación, diferenciación, movimientos celulares, comunicación intercelular y muerte celular programada.

1.2 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Para estudiar el desarrollo de los animales se recurre al análisis del mismo en organismos modelo. La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, es un organismo barato de mantener, tiene un ciclo de vida corto, su desarrollo se puede observar fácilmente mediante microscopía, y tiene un número reducido de cromosomas, con solo tres pares de autosomas y dos cromosomas sexuales. Además, mediante la inyección de DNA en el embrión se pueden producir transformantes con facilidad. Thomas Morgan inició su estudio

en el campo de la Genética, describiendo el gen *white* en 1910. Los trabajos de E. Lewis, C.Nüsslein-Volhard, E.Wieschaus, y muchos otros, han asentado a *D. melanogaster* como referencia para la Biología del Desarrollo, estableciendo de forma muy precisa el desarrollo embrionario. Además, disponemos de diversas líneas celulares para su estudio en cultivo, una gran colección de mutantes y multitud de líneas transformantes con herramientas como los sistemas de expresión bipartitos UAS/ Gal4 (Brand y Perrimon, 1993), *lexA/lexAop* (Lai y Lee, 2006) y QF/QS (Potter et al., 2010), el sistema Flp/FRT (Xu y Rubin, 1993), la disponibilidad de líneas RNAi para silenciar la práctica totalidad de los genes (Dietzl et al., 2007) o, recientemente, las herramientas de edición genómica basadas en el sistema CRISPR/Cas9 (Kondo y Ueda, 2013).

1.3 Ciclo vital de *D. melanogaster*

D. melanogaster es un insecto holometábolo, lo cual quiere decir que sufre una metamorfosis completa. Por lo tanto, en su ciclo de vida muestra cuatro estadios: huevo, larva, pupa, y adulto. A una temperatura óptima de 25 °C, *D. melanogaster* completa su ciclo vital en 10 días aproximadamente. El huevo eclosiona en un día, surgiendo una larva que se alimenta de fruta en estado de descomposición. El segundo día la larva muda, convirtiéndose en “Larva II”. El tercer día vuelve a mudar, se convierte en “Larva III”. Este estadio dura dos días, y se subdivide en “larva en alimentación” y “larva en ayuno” que describe el comportamiento previo a la pupación, en el cual la larva busca un lugar propicio para pupar. La pupación ocurre el quinto día, y en ella la larva se recubre de una cubierta protectora (el pupario) y sufre una metamorfosis completa. Esta fase dura cinco días. Entonces, las moscas adultas salen de la pupa, siendo fértiles 8 horas después (Fig. 1).

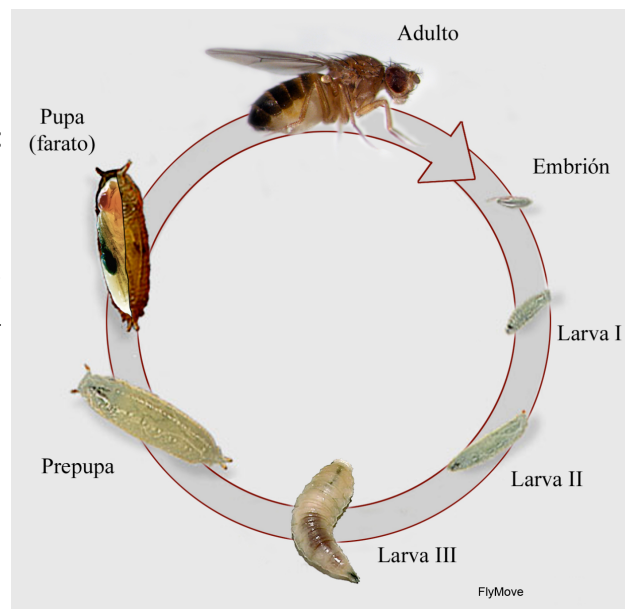


Figura 1. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*. Se muestran las fases de embrión, larva I, II y III, prepupa, pupa y adulto (Modificado de Flymove).

1.4 Embriogénesis de *D. melanogaster*

1.4.1 Embriogénesis temprana: la segmentación

La embriogénesis en *D. melanogaster* es la suma de procesos biológicos que intervienen en la transformación del huevo fecundado en una larva. Después de la fecundación, las

divisiones son sincitiales, posteriormente ocurre la celularización, y después la gastrulación, que es un proceso que mediante movimientos de invaginación da lugar a las tres capas de tejido que conforman la organización básica de *D. melanogaster*: el endodermo, el mesodermo, y el ectodermo. Posteriormente, se produce el proceso de segmentación, un proceso morfogénico en el que los productos de los genes maternos que se han transcrito durante la ovogénesis (*bicoid*, *hunchback*, *nanos* y *caudal*) (Frohnhofer y Nüsslein-Volhard, 1986; Nüsslein-Volhard et al., 1987; Wang y Lehmann, 1991) se traducen y determinan una cascada de regulación muy precisa pero de corta duración, producida por los genes “Gap” y los genes de la “Regla Par”, que va delimitando territorios cada vez menores, y que culmina con la activación permanente de los genes de Polaridad Segmental *engrailed* (*en*), *hedgehog* (*hh*), *wingless* (*wg*), y *Cubitus-interruptus* (*Ci*) (revisado en Akam, 1987 y en Ingham, 1988; Fig. 2)

Los genes de la “Regla Par” activan o reprimen el gen de polaridad segmental *engrailed* (*en*), que se expresa a lo largo de todo el embrión en bandas transversales. Cada segmento está dividido en dos compartimentos, el anterior (a) y el posterior (p), quedando este último definido por la expresión de *en*, mientras que el compartimento anterior queda definido por su ausencia. En activa la expresión de *hedgehog* (*hh*), un gen que codifica para un morfógeno que migra anteriormente unas filas de células más allá de su dominio de expresión y activa la expresión de *wg* que, junto con la expresión de *ci*, especificará el compartimento anterior (García-Bellido y Santamaría, 1972; Lawrence y Morata, 1976; Kornberg et al., 1985; Eaton y Kornberg, 1990).

Los compartimentos forman unidades de linaje, es decir, las células de uno no se mezclan con las de otro, y tienen un papel primordial en la morfogénesis (García-Bellido et al, 1973). Los segmentos de *Drosophila* están formados por dos compartimentos, anterior (a) y posterior (p). Sin embargo, la expresión de los genes Hox que se describen a continuación, es no segmental en muchos casos (Ingham et al., 1985; Martínez-Arias y Lawrence, 1985; Hidalgo e Ingham, 1990; Angelini y Kaufman, 2005). Los parasegmentos (PS) es-

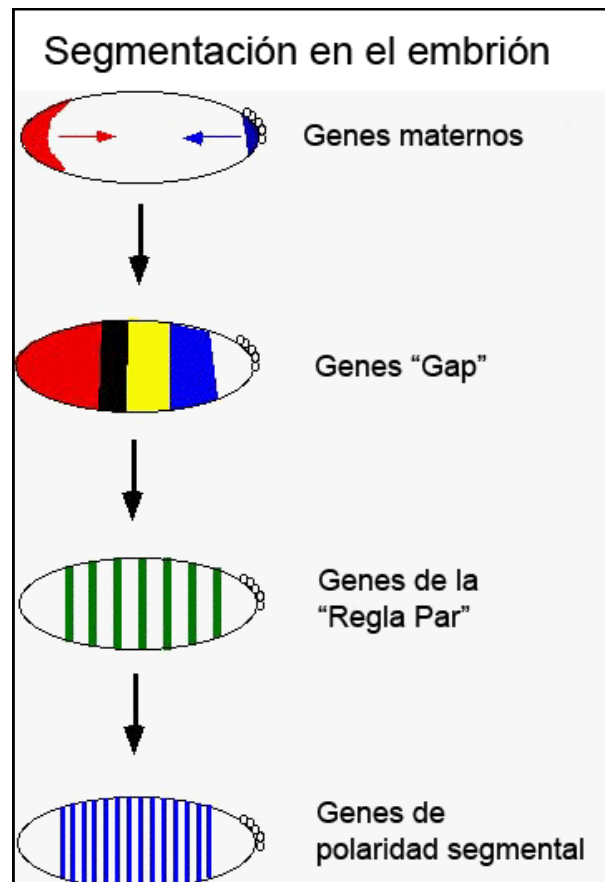


Figura 2. Segmentación en el embrión. La traducción de los transcritos maternos inicia una cascada de señalización que produce finalmente la activación de los genes de polaridad segmental (mod. de Dynamic Development, Univ. Calgary)

tán formados por el compartimento posterior de un segmento, y el anterior del segmento adyacente (Martínez-Arias y Lawrence, 1985). A pesar de ello, en la mayoría de los experimentos de esta tesis nos referimos a los segmentos y no a los parasegmentos porque en el adulto aquellos se reconocen más fácilmente.

1.4.2 Genes Homeóticos (genes Hox)

Los genes Homeóticos son los responsables de la especificación del eje anteroposterior (A/P) en todos los animales bilaterales, aunque su origen podría ser anterior al origen de éstos (Revisado en Schierwater y Kamm, 2010). Las mutaciones en los genes Homeóticos producen en muchos casos transformaciones de una estructura en otra, un fenómeno denominado homeosis (Bateson, 1894) y por el cual recibieron ese nombre. También se denominan genes Hox por presentar una secuencia conservada, el homeobox (que se traduce en una secuencia proteica, el homeodominio), y su expresión proporciona una especificidad única a cada parasegmento de *D. melanogaster*. Su expresión se encuentra regulada por los genes de la Regla Par, los genes “Gap”, y los genes de Polaridad Segmental.

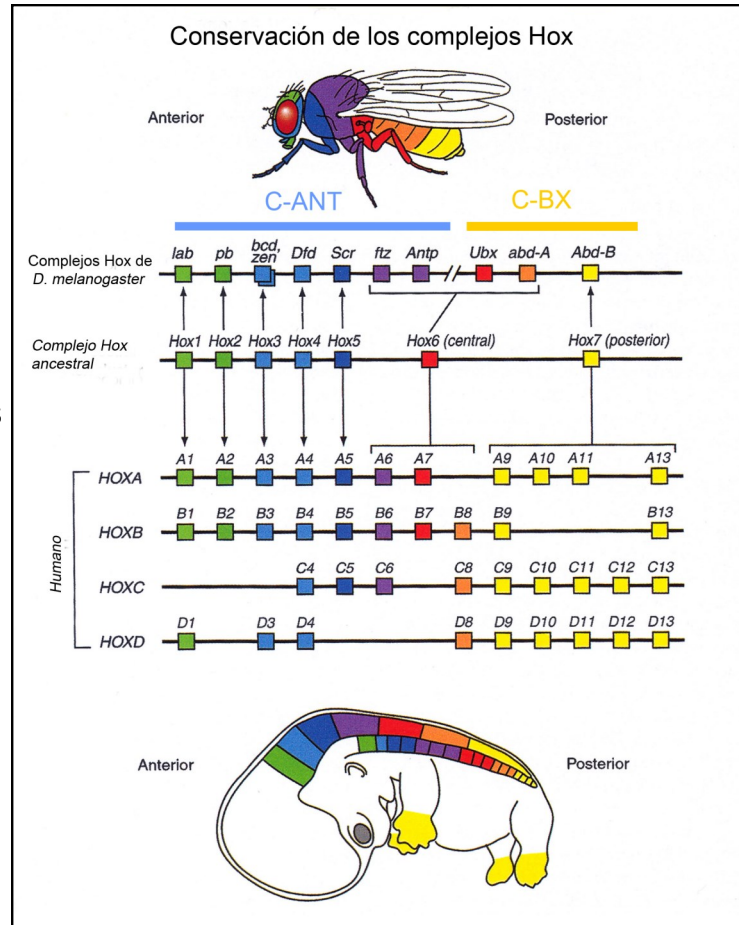


Figura 3. Conservación y colinearidad de los genes Hox. El código de colores en cada gen Hox permite apreciar la conservación de su posición en el cromosoma entre *D. melanogaster* y *H. sapiens*, su origen evolutivo desde un hipotético complejo Hox ancestral, así como la colinearidad de su expresión en ambas especies. El C-ANT incluye los genes *bcd*, *zen* y *ftz*, que no son homeóticos (Modificado de Veraksa et al., 2000).

Los genes Hox se encuentran agrupados en dos complejos situados en el cromosoma 3R, que de proximal a distal son el complejo Antennapedia (ANT-C), en donde se encuentran los genes Hox *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*), y *Antennapedia* (*Antp*), y el complejo Bithorax (BX-C), formado por *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*). Están muy conservados en diferentes especies, y en vertebrados se agrupan en cuatro complejos, A, B, C, y D, que presentan algunas variaciones en su organización entre sí, ya que no todos los genes (del 1 al 13) están en los cuatro complejos, y existen varias copias en alguno de los complejos de los genes

homólogos a *Abd-B* (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero et al., 1985; Tjong et al., 1985; Kaufman et al., 1990; Graham et al., 2003; Duboule y Dollé, 1993, revisado en Wedeen et al., 2013). La expresión de los genes Hox a lo largo del eje del cuerpo se corresponde con su posición en los complejos, tanto en *Drosophila* como en vertebrados; así, en la mosca, *lab*, el más proximal, es el de expresión más anterior, y *Abd-B*, el más distal, el más posterior. Este fenómeno se denomina *colinearidad* (Lewis, 1978) (Fig. 3).

Otra propiedad de los genes Hox es la *jerarquía transcripcional*, que indica que los genes posteriores pueden reprimir la expresión de los anteriores (Hafen et al., 1984; Struhl y White, 1985). A su vez, en los casos en los que hay coexpresión de varios genes Hox, se da el fenómeno de la *supresión fenotípica*, en la que los genes más posteriores hacen prevalecer su función sobre los anteriores. Para explicar este fenómeno, se ha propuesto un modelo de competición de las proteínas Hox por las secuencias reguladoras de los genes diana, sobre las que las proteínas posteriores tendrían mayor afinidad (González-Reyes y Morata, 1990; González-Reyes et al., 1990; Noro et al., 2011, revisado en Duboule y Morata, 1994 y en Mann et al., 2009)

Después de su activación, los genes Hox mantienen su expresión gracias a la regulación epigenética por los genes de los grupos Polycomb (*Pc*) y trithorax (*trx*). El grupo *Pc* mantiene el estado reprimido de los genes Hox en donde no se expresan, y el grupo *trx* lo mantiene activado en sus dominios de expresión. Los genes del grupo *Pc* y *trx* se expresan de forma ubicua, y actúan remodelando la cromatina para que sea accesible o no a la maquinaria transcripcional. De esa manera, mantienen el estado de activación transcripcional aunque las señales activadoras iniciales se hayan perdido (Kennison, 1995; Pirrotta, 1995; Schuettengruber et al., 2007; Bantignies et al., 2011).

1.5 Procesos de desarrollo tardíos: los discos imaginales y los nidos de histoblastos

1.5.1 Introducción

D. melanogaster es un insecto holometábolo, lo cual quiere decir que entre la última fase larvaria y la forma adulta pasa por una metamorfosis completa. En dicha metamorfosis, muchas estructuras de la larva mueren por apoptosis y son remplazadas por estructuras de nueva formación. Este proceso es notable en el caso de las estructuras externas, que provienen en su totalidad de grupos de células formadas durante la etapa embrionaria llamados precursores imaginales. Los hay de dos tipos: los discos imaginales, y los nidos de histoblastos (Fig. 4).

1.5.2 Los discos imaginales

Los discos imaginales son sacos epiteliales que se encuentran anclados por su base,

flotando en la hemolinfa. Se originan a partir del ectodermo en la etapa embrionaria, proliferan fundamentalmente hasta la etapa de larva III, y su diferenciación ocurre tanto en la etapa larvaria como durante la pupación (Cohen, 1993). Los discos imaginales dan lugar a toda la cabeza (incluyendo los ojos) y el tórax, y a todos sus apéndices asociados: las antenas, apéndices bucales, patas, alas y halterios, la genitalia externa y la interna (salvo las gónadas), el terguito octavo (T8) y la analia. El disco imaginal genital es el que está situado más posteriormente en la larva, y en el adulto da lugar a la genitalia interna y externa, al

terguito octavo en las hembras y a la analia. Es el único disco impar, y se origina a partir de primordios independientes provenientes de una invaginación de células de los segmentos abdominales (A) A8, A9 y A10. (Jürgens y Hartenstein, 1993). A pesar de que su origen es similar en ambos sexos, en el estadio de larva III el disco presenta un fuerte dimorfismo sexual: en hembras está más desarrollado el A8 que el A9, y en machos ocurre al contrario, mientras que el A10 es de tamaño similar en ambos sexos. Al término del desarrollo, el A8 da lugar al T8 y a la genitalia en las hembras, mientras que en los machos produce un pequeño segmento abdominal no esclerotizado. En los machos, el A9 genera la genitalia masculina, y en las hembras da lugar a las glándulas parovarias y a una pequeña parte del útero. El A10 en ambos sexos da lugar a la analia y al último tramo del sistema digestivo (Nöthiger et al., 1977; Keisman et al., 2001; Sánchez y Guerrero, 2001; Christiansen et al., 2002; Estrada et al., 2003)

La identidad del disco genital está especificada por el gen *Hox abd-A* y la proteína *Abd-B M* en el A8, la proteína *Abd-B R* en el A9 y el gen *caudal (cad)* en el A10 (Freeland y Kuhn, 1996; Casares et al., 1997; Estrada et al., 2003), así como por los genes de determinación sexual. La determinación sexual somática en *Drosophila* se especifica en último término por las dos isoformas del factor de transcripción *Doublesex (Dsx)*: *Doublesex Male*

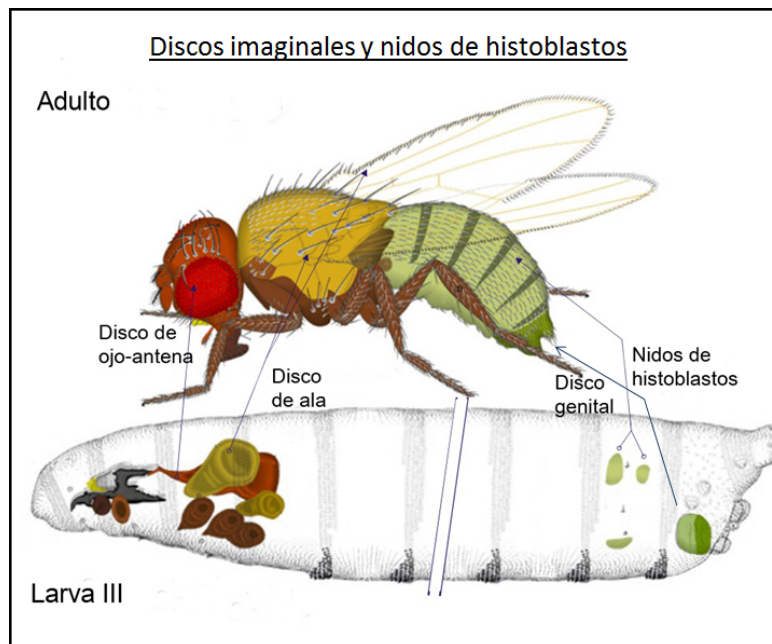


Figura 4. Discos imaginales y nidos de histoblastos. Se muestran, coloreados, los discos imaginales, tanto los de la región anterior de la larva (de los cuales se detallan el disco de ojo-antena y el de ala), como el disco genital, que se sitúa en la región posterior, así como las estructuras que forman, y, a modo de ejemplo, los nidos de histoblastos del séptimo segmento abdominal (A7), que están compuestos por el nido dorsal anterior, el dorsal posterior, el nido espiracular, y el nido ventral (mod. de V. Hartenstein, 1993. Atlas of *Drosophila* development).

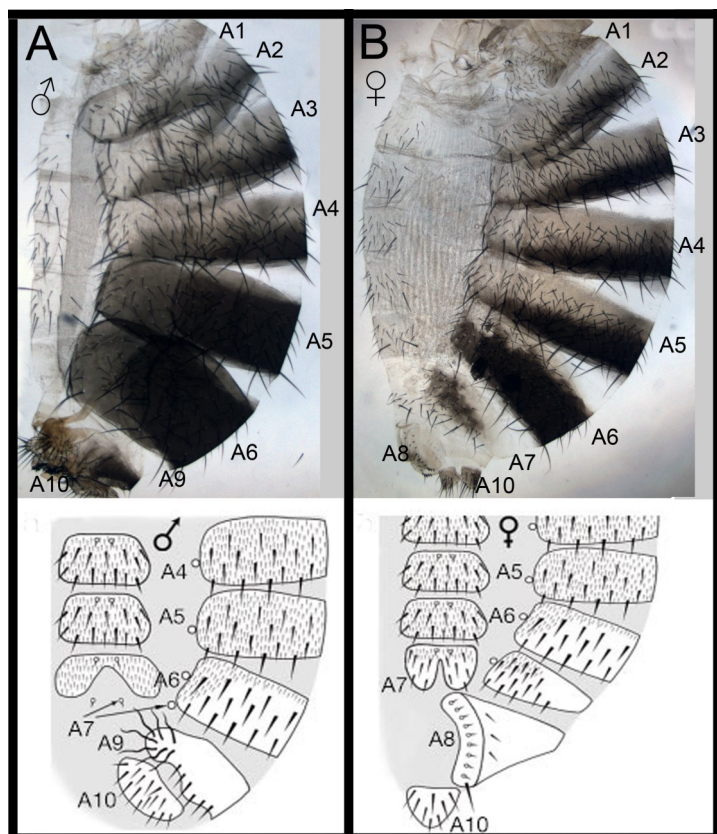
(DsxM), en machos, y Doublesex Female (DsxF), en hembras (Ver apartado 1.5.5). Dsx se expresa en todo el disco genital salvo en la región lateral del disco (Arbeitman et al., 2010; Robinett et al., 2010).

1.5.3 Desarrollo del abdomen

En esta tesis nos referimos como abdomen propiamente dicho al que se deriva de los nidos de histoblastos, esto es, los segmentos A1-A7, por lo que excluimos de esa categoría al T8, que deriva del disco genital.

El abdomen adulto de *Drosophila* está formado por unas placas esclerotizadas dorsales que se encuentran pigmentadas en su zona posterior, llamadas terguitos (T), otras ventrales no pigmentadas, llamadas esternitos (E), y un epitelio flexible llamado pleura que los comunica lateralmente. En cada hemipleura hay un espiráculo que comunica el sistema traqueal con el medio exterior. Los terguitos adyacentes están conectados entre sí por una membrana flexible transparente,

Figura 5. Morfología del abdomen en machos (A) y hembras (B). El A1 tiene cerdas pequeñas y no tiene esternito. Del T4 al T5 la densidad de tricomas se reduce en ambos sexos, y se restringe en el T6 a una estrecha banda en la región anterior del terguito y en los laterales del mismo. En el T7 de hembras los tricomas solo se encuentran lateralmente. En los machos el T5 y el T6 se encuentran totalmente pigmentados, el E6 no tiene quetas y está ligeramente pigmentado, y el A7 desaparece, salvo su espiráculo y sus sensilas ventrales. En las hembras, en el T6 la banda pigmentada aumenta de tamaño respecto al T5, y el T7 está formado por dos hemiterguitos de forma triangular, mientras que el E7 se encuentra reducido, es más alargado que los anteriores, y se encuentra parcialmente dividido en dos (dibujos inferiores, Kopp et al., 2000).



que suele estar replegada, llamada “membrana intersegmental”. Todos los segmentos abdominales tienen características únicas que permiten diferenciarlos, salvo el A3 y el A4, muy similares. Además, los segmentos A5, A6 y A7 presentan dimorfismo sexual (Fig. 5).

El abdomen adulto se origina a partir de grupos de células diploides (histoblastos) que se especifican en el embrión y se mantienen quiescentes durante el periodo larvario.

En la larva III, se encuentran rodeadas por las células poliploides que constituyen el epitelio larvario (García-Bellido y Merriam, 1971; Guerra et al., 1973; Madhavan y Schneiderman, 1977; Madhavan y Madhavan, 1980). Estas agrupaciones se denominan “nidos de histoblastos”, de los cuales en cada hemisegmento (derecho o izquierdo) hay cuatro: uno dorsal anterior, que dará lugar al terguito, otro dorsal posterior, que dará lugar a la membrana intersegmental, uno espiracular, que producirá el espiráculo, y uno ventral, que producirá el esternito. Los histoblastos comienzan a proliferar al comienzo de la pupación, en respuesta a señales hormonales que activan la vía del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la de la insulina, y su crecimiento ocurre de manera simultánea a la muerte por apoptosis y extrusión de las células larvarias (Ninov et al., 2007; 2009). A las 18 h. después de la formación del pupario (DFP), a una temperatura de 25 °C, se produce la fusión del nido ventral con el espiracular. A las 18-20 h. DFP se produce la fusión de los nidos dorsales anterior y posterior. Entre las 24 y las 28 h. DFP se produce la fusión entre el nido dorsal y el espiracular. Entre las 28 y las 38 h. DFP comienza la fusión entre los nidos dorsales o ventrales de segmentos adyacentes, que termina a las 40 h. DFP, momento en el que han desaparecido todas las células larvarias, y el epitelio abdominal es un continuo de histoblastos (Madhavan y Sneidermann, 1977; Madhavan y Madhavan, 1980; Ninov et al., 2007).

La formación del patrón en el abdomen ocurre durante el estadio de pupa, y está determinada por los genes de polaridad segmental, por los genes Hox y por la vía de la determinación sexual. Los genes de polaridad segmental se encargan de formar los patrones básicos que se repiten en los diferentes segmentos, la vía de la determinación sexual establece las diferencias entre machos y hembras, y los genes Hox entre los diferentes segmentos, en algunos de ellos regulando la transcripción de los genes de determinación sexual, de genes de polaridad segmental, o de genes que codifican otros factores de transcripción.

El proceso de segmentación en el abdomen pupal ocurre de la manera siguiente: al comienzo de la pupación, los nidos de histoblastos dorsales posteriores expresan *en*, el cual induce la expresión de *hh*. Cuando se produce la fusión con el nido dorsal anterior del mismo segmento, cuyas células no expresan *en* ni *hh*, la proteína Hh se extiende hacia todo el compartimento anterior (Struhl et al., 1997 a, b; Kopp et al., 1997), a diferencia de lo que ocurre en los discos imaginales, en los que su efecto es de corto alcance (Tabata et al., 1995; Zecca et al., 1995). En el nido de histoblastos ventral el proceso es similar, pero desde el principio está formado por ambos compartimentos. La proteína Hh que llega al compartimento anterior se une a su receptor Patched, lo cual provoca la activación de los genes *wg* y *decapentaplegic (dpp)* en dominios excluyentes. *wg* se expresa en el esternito y en el terguito medio-lateral, mientras que *dpp* se expresa en la pleura y en una estrecha banda en la región más dorsal del terguito (línea dorsal). La expresión de *wg* promueve la identidad de terguito y de esternito, mientras que la de *dpp* da identidad de pleura (Shirras y Couso, 1996; Kopp et al., 1999). La expresión de *dpp* en la línea dorsal del terguito tam-

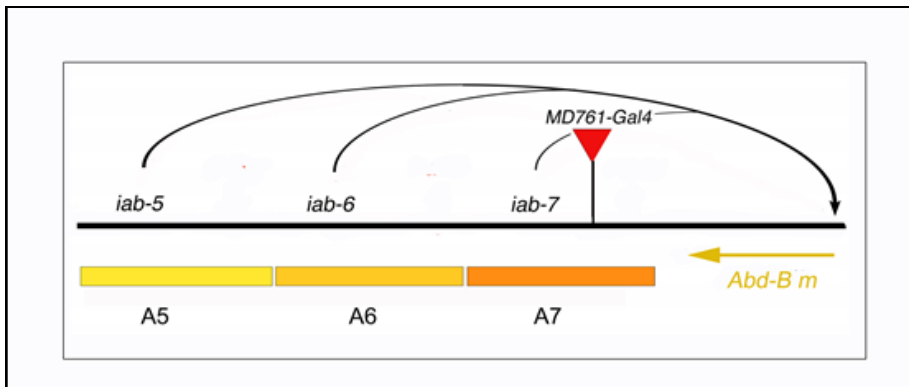
bién activa la pigmentación en esa región (Kopp et al., 1999). Finalmente, Hh activa a *optomotor-blind* (*omb*) en la región posterior del terguito, produciendo una banda oscura en dicha región (Kopp et al., 1997).

La expresión de los genes Hox es la responsable de las características específicas de los diferentes segmentos del abdomen, regulando la pigmentación, el tamaño y la forma de los terguitos y esternitos, y la distribución de cerdas y tricomas (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985; Karch et al., 1985; Kopp y Duncan, 2002; Singh y Mishra, 2014). *Ubx* se expresa en el A1 y *abd-A* se expresa en el A2-A7, incrementando su expresión hacia los segmentos posteriores, que son máximos en el A6 (Kopp y Duncan, 2002). En el segmento A7, *abd-A* se expresa de forma reducida debido a su represión por *Abd-B* (Wang et al., 2011, Singh y Mishra, 2014). *abd-A* especifica los segmentos A2-A4 en solitario, y en las mutaciones de *abd-A* se producen transformaciones de estos segmentos hacia A1 (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985), mientras que en el A5-A6 coopera con *Abd-B*, y su falta provoca transformaciones hacia segmentos anteriores (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985; Karch et al., 1985).

1.5.4 *Abdominal-B*

El gen Hox *Abd-B* se expresa y requiere en los segmentos posteriores de *Drosophila*, del A5

Figura 6. La región *iab-7* es la responsable de la activación de la transcripción de *Abd-B* en el segmento A7. Se muestran el transcrito *Abd-B-M*, las zonas reguladoras *iab-5*, *iab-6* e *iab-7*, que regulan la expresión de *Abd-B* en los segmentos A5, A6 y A7, respectivamente, y la inserción *MD761-Gal4* en la región *iab-7*. En la parte inferior se indica como los niveles de la proteína *Abd-B* aumentan en segmentos posteriores.



al A9 (PS embrionarios 10 a 14) (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985), incrementando su expresión hacia los segmentos posteriores, y siendo ésta mayor en el A7 que en el A6 (Celniker et al., 1989; Kopp et al., 2000; Kopp y Duncan, 2002; Foronda et al., 2012; Wang y Yoder, 2012). *Abd-B* codifica para dos isoformas, *Abd-B M*, de 56 KDa, y *Abd-B R*, de 36 KDa. Ambas formas comparten tanto el homeodominio como los motivos conservados adyacentes a él, pero la proteína *Abd-B R* carece de los 29 aminoácidos N-terminales que posee la proteína *Abd-B M* (Zavortink y Sakonju, 1989; Celniker et al., 1989). *Abd-B* y sus proteínas homólogas de vertebrados son las proteínas Hox con una secuencia más divergente respecto al resto de proteínas Hox (revisado en Merabet et al., 2009). *Abd-B M* se expresa del A5 al A8, mientras que *Abd-B-R* se expresa únicamente en el A9 (Casanova et al., 1986; Celniker et al., 1989; Zavortink y Sakonju, 1989; Boulet et al., 1991). Existen diversas mutaciones en las regiones reguladoras de *Abd-B* que producen cambios en sus niveles de expresión en distintos metámeros, lo que ha permitido asociar dichos cambios con la

identidad de cada segmento. Se ha definido una región reguladora de *Abd-B* por cada segmento, denominándose éstas *iab-5*, *iab-6*, *iab-7*, e *iab-8,9* (responsables de regular el gen en los segmentos A5-A9). Así, las mutaciones de pérdida de función en cada región reguladora producen transformaciones hacia los segmentos anteriores, y las de ganancia de función, hacia los segmentos posteriores (Karch et al., 1985; Celniker et al., 1990; Gyurkovics et al., 1990; Sánchez-Herrero, 1991; Galloni et al., 1993; Hoppmann et al., 1995; Akbari et al., 2006). Por lo tanto, los niveles de expresión de *Abd-B*, controlados por la regiones *iab-5*, *iab-6*, e *iab-7* determinan la identidad del A5, A6, y A7 en el abdomen (Fig. 6), y la falta de *Abd-B* en estos segmentos (A5-A7) hace que se transformen a A4 (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985). Se ha descrito que dicha expresión es similar en machos y hembras (Kopp et al., 2000; Wang et al., 2011) y que la expresión de *Abd-B* es más alta en las células poliploides que van a dar lugar a las cerdas (Kopp y Duncan, 2002).

1.5.5 Diferencias sexuales

La vía de determinación sexual en *Drosophila* está activada por el balance entre el cromosoma X y los autosomas, aunque también se ha propuesto que su activación no se debe a esta relación sino a varios factores de transcripción que se encontrarían en el cromosoma X (Erikson y Quintero, 2007), y sus efectores finales son *fruitless (fru)* y *doublesex (dsx)*. Cuando hay dos cromosomas X por unidad completa de autosomas, se activa la transcripción de *Sex lethal (Sxl)*. La activación de *Sxl* en las hembras produce el splicing alternativo de los transcritos del gen *transformer (tra)*, que permiten su traducción a proteína. *tra* junto con *tra-2* provoca el splicing alternativo de los transcritos *dsx* y *fru* en las hembras. La forma femenina de *fru* no se traduce, mientras que *dsx* da lugar a la proteína Doublesex-Female (DsxF). En los machos no hay activación de *Sxl* y por ello los transcritos de *tra* sufren splicing por defecto, lo que provoca que el mRNA no se traduzca. Esto, a su vez, hace que *dsx* y *fru* sufran un splicing por defecto, produciendo mRNAs que darán lugar a las proteínas Doublesex Male (DsxM) y Fru. Fru se expresa únicamente en el sistema nervioso (revisado en Manoli et al., 2006), mientras que Dsx lo hace tanto en el soma como en el sistema nervioso (Christiansen et al., 2002; Billeter et al., 2006).

La forma en la que entendemos la especificación sexual ha sufrido una revolución desde que en 2010 se descubrió que *dsx* se expresaba de forma localizada, y no ubicua, como se pensaba antes (Robinett et al., 2010; Rideout et al., 2010). Así, no todas las células de *Drosophila* tienen identidad sexual ya que esta depende de la expresión de *dsx*, que además puede tener diferentes niveles de intensidad. En la pupa, *dsx* se expresa en todo el epitelio abdominal (Rideout et al., 2010; Robinett et al., 2010) pero aumenta en el A7 respecto al A6, al igual que ocurre con la expresión de *Abd-B* (Wang y Yoder, 2012). Los niveles de expresión de *dsx* son dimórficos, siendo 2.5 veces mayores en el A7 de machos que en el de hembras (Wang y Yoder, 2012). La activación de *dsx* por *Abd-B* explica en gran parte su patrón de expresión en el abdomen posterior (Wang y Yoder, 2012; Foronda et al., 2013),

pero las diferencias de los niveles de expresión entre sexos quedan sin explicar.

1.5.6 Regulación de la pigmentación en el abdomen

La pigmentación contribuye a diferenciar los segmentos del abdomen entre los machos y las hembras. Las rutas que especifican la pigmentación son bien conocidas, e implican tanto la síntesis de los pigmentos, como su activación por factores de transcripción (Wittkopp et al., 2003). Algunos patrones de pigmentación se repiten en varios segmentos, estando controlados por los genes de polaridad segmental. Así, la activación de *omb* es la responsable de la banda pigmentada que hay en la región posterior de cada terguito, mientras que la activación de *dpp* en la región dorsal del terguito produce una estrecha banda longitudinal pigmentada en esa zona (Kopp et al., 1997; Kopp et al., 1999). En contraste con estos patrones comunes, *bab* especifica las diferencias entre distintos segmentos (A5-A7) y entre machos y hembras (Kopp et al., 2000; Couderc et al., 2002), y no interacciona genéticamente con *omb* (Kopp et al., 1997).

El locus *bab* contiene una duplicación en tándem que codifica dos genes estructural y funcionalmente similares, *bab1* y *bab2*. Codifican factores de transcripción que actúan como represores de la pigmentación: la pérdida de *bab* produce una pigmentación oscura en todo el abdomen, mientras que su sobreexpresión produce una pigmentación clara (Kopp et al., 2000, Couderc et al., 2002, Lours et al., 2003). *bab* es el gen responsable de las diferencias de pigmentación entre machos y hembras, ya que su expresión se encuentra reprimida en el A5-A6 de machos por el efecto combinado de Abd-B y DsxM, mientras que en las hembras se encuentra activada por DsxF y Abd-B (Kopp et al., 2000; Williams et al., 2008).

homothorax (hth) y *extradenticle (exd)* son otros genes implicados en la pigmentación, que en ciertos casos se comportan de manera similar a *bab*. La pérdida de *exd* en el A1-A4 produce una pigmentación oscura (González-Crespo y Morata, 1995; Rauskolb et al., 1995), y la pérdida de *hth* en el A1-A4 produce el mismo efecto (Ryoo et al., 1999), mientras que la sobreexpresión de *hth* produce una pigmentación clara en la región posterior de machos (A5 y A6) (Ryoo et al., 1999, Rogers et al., 2013). Se ha descrito que *hth* es un regulador positivo de la región activadora de *bab* en la región posterior (*bab dimorphic CRE*) (Rogers et al., 2013), por lo que ambos genes podrían formar parte de la misma cascada de señalización.

1.5.7 Morfología del A7: represión en machos y reducción en hembras

1.5.7.1 Introducción

Como se indicaba antes, los genes Hox proporcionan una identidad específica a los segmentos del abdomen. El segmento del abdomen posterior que sufre una mayor diferenciación es el A7, que no se desarrolla en los machos (salvo su espiráculo, que se desplaza junto al del A6, y dos sensilas ventrales), mientras que en las hembras es menor que en

los segmentos anteriores, el terguito se divide en dos placas triangulares (hemiterguitos) y el esternito se reduce. *Abd-B* afecta a los procesos morfogénéticos que se detallan en los siguientes puntos, los cuales pueden explicar el peculiar desarrollo del segmento A7 en machos y hembras.

1.5.7.2 Reducción del tamaño del A7

a) Menor ritmo de división

Al comienzo de la pupación, el tamaño de los nidos de histoblastos del A7 es semejante al que tienen en el resto de segmentos del abdomen (Madhavan y Schneidermann, 1977). Entre las 22-26h. DFP el número de células en mitosis se reduce, de forma más marcada en los machos que en las hembras (Wang et al., 2011). Como consecuencia, alrededor de las 30h. DFP los nidos de histoblastos dorsales del A7 tienen menos células que los del A6. En parte, este efecto se debe a la regulación negativa de la vía EGFR por *Abd-B* (Foronda et al., 2012). Por otra parte, se especula que la expresión de *wg* también podría intervenir en este proceso. *wg* es un morfógeno que promueve identidad de terguito y esternito, en contraposición con la de pleura (Shirras y Couso, 1996; Kopp et al., 1999). Se expresa en los nidos de histoblastos anteriores de todos los segmentos, salvo en el A7 de machos, en donde se encuentra reprimido por *Abd-B* y *DsxM*. Esta represión podría ser necesaria para la eliminación del segmento, ya que la expresión ectópica de *wg* en el mismo produce un pequeño terguito (Wang et al., 2011; Foronda et al., 2012; Sing y Mishra, 2014).

b) Transformación segmental

Otro proceso por el que se reduce el tamaño del A7 en machos es la transformación compartimental. Gracias a la comparación de la expresión de En y de un indicador suyo que muestra cierto retraso en su activación (*en-Gal4 UAS-GFP*), se ha establecido que las células del A7a más próximas al A6p ganan la expresión de En, pasando a formar parte del A6p. De esta forma este mecanismo contribuye a reducir el tamaño del A7.

1.5.7.3 Eliminación del A7 en machos

a) apoptosis

Aunque la apoptosis tiene un papel importante en la morfogénesis del abdomen de *Drosophila*, siendo necesaria para la eliminación de las células larvarias durante su reemplazamiento por histoblastos (Ninov et al., 2007), su bloqueo en el A7 de los machos mediante la sobreexpresión de los inhibidores de la apoptosis Diap1 o P35 no impide la desaparición del A7 (Wang et al., 2011; Foronda et al., 2012). A pesar de ello, puede jugar un papel secundario, y se ha encontrado que alrededor del espiráculo del A7 de ambos sexos hay mayores niveles de apoptosis que en el resto de segmentos abdominales (Wang et al., 2011).

b) Extrusión de los histoblastos

Alrededor de las 36-42 h. DFP, las células del A7 que persisten en ese momento se eliminan por extrusión. El gen *extramacrochaetae* (*emc*) participa en este proceso, que está asociado a un incremento de los niveles de Miosina II no muscular (Foronda et al., 2012).

bab (ver punto 1.5.6) es un factor de transcripción que debe estar reprimido para que se produzca la eliminación del A7 en machos (Kopp et al., 2000), mientras que en las hembras, se requiere para evitar la fusión de los hemiterguitos (Couderc et al., 2002). Otro factor de transcripción que interviene en la extrusión es *tea-shirt* (*tsh*), un gen que se expresa con más intensidad en el A1 y el A7 de ambos sexos que en los segmentos intermedios del abdomen (Wang et al., 2013). La activación de *tsh* se requiere para la completa eliminación de A7 en machos, un efecto que podría estar mediado por la regulación de *wg* y *bab*, ya que estos genes se expresan ectópicamente en mutantes *tsh* (Fig. 7).

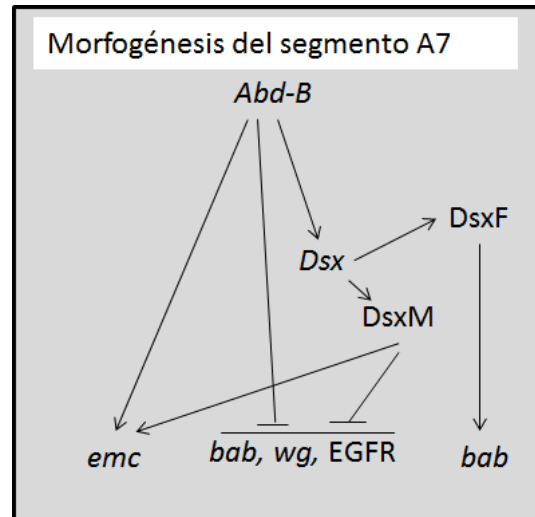


Figura 7. Regulación de la morfogénesis en el segmento A7. Abd-B, junto con DsxM en machos y DsxF en hembras, regula diversos genes que se han relacionado con la desaparición del segmento en machos y con su reducción en hembras (modificado de Foronda et al., 2012).

1.6 Especificidad de las proteínas Hox

1.6.1 Introducción

La transcripción de los genes Hox produce proteínas que actúan como factores de transcripción, uniéndose al DNA, por lo que la especificidad de esa unión es clave para su función. A pesar de su alta especificidad *in vivo*, los estudios de unión a secuencias de DNA *in vitro* muestran una baja especificidad, en la que Abd-B se une a la secuencia consenso TTAT y el resto de las proteínas Hox de *Drosophila* se unen a la secuencia consenso TAAT (Noyes et al., 2008). Estas secuencias, debido a su corta longitud, son demasiado frecuentes en el genoma, y no permiten explicar la especificidad de las proteínas Hox. A pesar de esto, se ha descrito que la unión de proteínas Hox como monómeros es frecuente (Ekker, 1994; Galant et al., 2002), y en distintos trabajos se ha observado que la especificidad de las distintas proteínas Hox por el DNA es asimismo distinta (Graba et al., 2007; Pearson et al., 2005; Hueber et al., 2007; Slattery et al., 2011). Una posibilidad para explicar esta paradoja es que la especificidad de las proteínas Hox no emane de su unión simple al DNA, sino de su unión a secuencias reguladoras con una arquitectura precisa, lo cual plantea que en las proteínas Hox puede haber determinantes de la especificidad que no dependan de la unión al DNA, sino de otras proteínas, ya sean cofactores (lo cual implicaría que la secuen-

cia de unión sería un poco más larga) o elementos mediadores.

1.6.2 Unión al DNA: unión monomérica

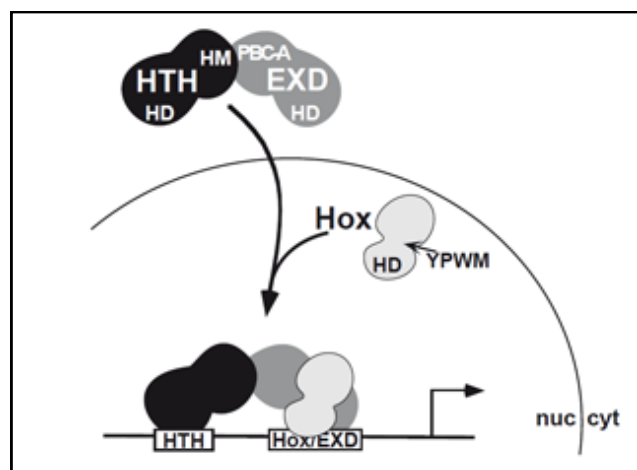
Las proteínas Hox se unen al DNA por su homeodominio, un motivo conservado de 60 aminoácidos formado por un brazo flexible N-terminal seguido de tres hélices alfa. Las hélices 1 y 2 son antiparalelas, y la hélice 3 se sitúa perpendicular a ellas, formando estas dos últimas un motivo hélice-vuelta-hélice. La mayoría de los contactos con el DNA ocurren a través de la hélice 3, que también se denomina “hélice de reconocimiento” y que contacta con el surco mayor del DNA a través de los residuos Isoleucina 47 (I47), Glutamina 50 (Q50), y Asparagina 51 (N51), mientras que el brazo N-terminal contacta con el surco menor del DNA por su Arginina 5 (R5) (Gehring et al., 1994). El hecho de que todos los determinantes de la unión estén conservados en las proteínas Hox plantea la posibilidad de que la especificidad de las mismas se determine en regiones fuera del homeodominio (Revisado en Rezsohazy et al., 2015). Con experimentos con proteínas quiméricas, se ha encontrado que el brazo N-terminal del homeodominio incrementa la especificidad (Mann y Hogness, 1990; Lin y McGinnis, 1992). Esto se une a que los sitios de unión de las proteínas Hox suelen estar flanqueados por sitios de unión de otras proteínas, sugiriendo que la unión al DNA de las proteínas Hox requiere en algunos casos la presencia de cofactores que interaccionan con ellas y pueden unirse al DNA (Mann y Chan, 1996; Biggin y McGinnis, 1997; Gebelein et al., 2002; Stobe et al., 2009). Los cofactores mejor conocidos de las proteínas Hox son los codificados por los genes *extradenticle* (*exd*) y *homothorax* (*hth*).

1.6.3 Los cofactores Extradenticle y Homothorax

La proteína Exd pertenece a la familia de factores de transcripción TALE (Three Aminoacid Loop Extension). Sus homólogos en mamíferos son la familia Pre B Cell Leukemia Factor1-4 (Pbx 1-4). Exd es una proteína que se localiza en el citoplasma cuando está inactiva, y en el núcleo cuando está activa (Mann y Abu-Shaar, 1996; Aspland y White, 1997).

El gen *hth* (en mamíferos, sus homólogos codifican para las proteínas Meis y Prep) codifica para un factor de transcripción con homeodominio que también forma

Figura 8. Translocación de Exd por Hth del citoplasma al núcleo, en donde el dímero se une a una proteína Hox por su HX (YPWM), y posteriormente el trímero se une al DNA por los homeodominios que tienen las tres proteínas (modificado de Ryoo et al., 1999)



parte de la familia de proteínas TALE (Rieckhof et al., 1997; Kurant et al., 1998; Pai et al., 1998). El gen da lugar a seis isoformas (Corsetti y Azpiazu, 2013), de las cuales tres incluyen un homeodominio de unión al ADN y un dominio HM de translocación de Exd al núcleo (Aspland y White, 1997; Pai et al., 1998; Abu-Shaar et al., 1999; Corsetti y Azpiazu, 2013). Hth se requiere para la translocación de Exd al núcleo y, por tanto, para su activación, lo cual ha llevado a considerar ambos genes como una unidad funcional (Mann y Abu-Shaar, 1996; Aspland y White, 1997; Rieckhof et al., 1997; Kurant et al., 1998; Pai et al., 1998) (Fig. 8). Además de su papel como cofactor de proteínas Hox, *hth* también puede tener funciones independientes de *exd* y de las proteínas Hox (Casares and Mann, 1998; Yao et al., 1999; Azpiazu and Morata, 2000; Azpiazu and Morata, 2002; Salvany et al., 2009; Choo et al., 2011; Slattery et al., 2011; Corsetti y Azpiazu, 2013).

1.6.4 Unión al DNA: unión heteromérica.

Exd modifica la especificidad de las proteínas Hox: la mutación de *exd* provoca fenotipos homeóticos, alterando la identidad de los segmentos corporales sin modificar la expresión de los genes Hox, actuando a modo de cofactor (Peifer y Wieschaus, 1990; Rauskolb et al., 1993; González-Crespo y Morata, 1995; Rauskolb et al., 1995). Por ejemplo, Ubx y Abd-A aumentan su especificidad por una secuencia consenso de DNA cuando se les agrega Exd en experimentos *in vitro* (Chan et al., 1994; VanDjik y Murre, 1994). Exd se une a las proteínas Hox por su motivo TALE, que se encuentra en la vuelta entre la hélice 1 y 2 (Lu y Kamps, 1996), y tiene un homeodominio por el que se une al ADN (Passner et al., 1999; Piper et al., 1999).

La unión clásica de las proteínas Hox con Exd ocurre a través de la secuencia Y/F-P/T/L-W-M de aquéllas (Johnson et al., 1994), también llamada hexapéptido (HX) (Lu et al., 1995; Passner et al., 1999). El motivo HX es, de los que están fuera del homeodominio, el que se encuentra más conservado entre diferentes especies (Neuteboom et al., 1995), y también está presente en todas las proteínas Hox de *D. melanogaster* salvo en Abd-B, en donde en una posición homóloga solo se conserva el W (Sambrani et al., 2013). En los genes parálogos de Abd-B de mamíferos, que también conservan el W, este residuo se ha identificado como responsable de la unión a la proteína homóloga de Exd (Knoepfer et al., 1995; Shanmugam et al., 1997; Shen et al., 1997; LaRonde-LeBlanc y Wolberger, 2003). En algunos casos se ha encontrado que la mutación en el W central del HX es suficiente para impedir la unión cooperativa de la proteína Hox con PBX *in vitro* (Knoepfer et al., 1995; Shanmugam et al., 1997). Sin embargo, a pesar de que en los parálogos de Abd-B en mamíferos el W conservado media la interacción con PBX (Knoepfer et al., 1995; Shanmugam et al., 1997; Shen et al., 1997; LaRonde-LeBlanc y Wolberger, 2003), no está claro su papel en Abd-B, ya que en *Drosophila* se ha analizado el efecto de una mutación en el mismo sobre caracteres que no requieren Exd, como la represión de *Dll* (Sambrani et al., 2013).

Existen modelos de la interacción entre proteínas Hox y Exd (o su homólogo PBX) (Lu y Kamps, 1996; Chang et al., 1996; Chan et al., 1996), que más tarde se han confirmado con modelos cristalográficos y de RMN (Passner et al., 1999; Piper et al., 1999) (Fig. 9). Según estos modelos, tanto Exd como la proteína Hox se unen al DNA por sus N51 de la hélice III del homeodominio a 4 pb (pares de bases) de distancia. El brazo N-terminal de la proteína Hox interacciona con el surco menor, y también contacta con la hélice III de Exd. El dímero se une a una secuencia de 10 pb, TGATNNATNN, lo cual permite una mayor especificidad que la unión monomérica. Los dos sitios variables del centro (NN) son el sitio de unión del brazo N-Terminal, permitiendo diferenciar, por ejemplo, entre los sitios de unión de Ubx y Lab (Chan et al., 1996). Experimentos posteriores han confirmado la validez de este modelo, encontrando que el cambio de la identidad de las dos pares de base centrales (NN) también es suficiente para cambiar la activación de la región reguladora de Lab a Dfd (Chan et al., 1997). Sin embargo, se ha encontrado asimismo que un gen activado por Lab posee secuencias diferentes a las que se une esta proteína para regular la expresión de este gen (Ebner et al., 2005). En distintos trabajos con proteínas Hox quiméricas se ha establecido que el brazo N-terminal interviene en la especificidad de las proteínas Hox (Phelan y Featherstone, 1997; revisado en Mann et al., 2009). El brazo N-terminal forma, junto con el linker (la secuencia de las proteínas Hox entre el HX y el HD) una unidad de especificidad, que en ausencia de Exd está desestructurada, pero que con la unión de éste a la proteína Hox contacta con el DNA, permitiendo la unión del dímero Exd-Scr (Joshi et al., 2007) o Exd-Dfd (Joshi et al., 2010) a una diana específica. El residuo que participa en la unión al DNA en el brazo N-terminal es la R5 (Gehring et al., 1994), que en Abd-A y Ubx forma parte del motivo conservado GRQT, mientras que en Abd-B forma parte del motivo KRKP (Merabet et al., 2009), lo cual sugiere que esta región es importante para la especificidad de dichas proteínas (Figura 10).

Otra aproximación para estudiar la secuencia de unión de los dímeros Exd-Hox ha sido el método SELEX-seq, en el cual se seleccionan mediante EMSA secuencias aleatorias de 16 pares de bases en función de su afinidad en la unión con los dímeros Exd-Hox, y posteriormente se secuencian (Slattery et al., 2011). Los autores de este trabajo concluyen que la secuencia de unión de los dímeros es diferente a la de la suma de la de los monómeros, y que hay tres grupos de especificidad, que respetan la colinearidad: clase 1, Lab y Pb, clase 2, Dfd, Scr y Antp, y clase 3, Ubx, Abd-A y Abd-B. Finalmente, un trabajo reciente incide en la importancia de la topología de los sitios de unión de varios dímeros Exd-Ubx en la región reguladora de un gen diana: dependiendo de la secuencia de esta región, la “forma” del DNA cambia ligeramente, y esto permite que diferencias latentes en especificidad entre diferentes dímeros Exd-Hox se pongan de manifiesto para una regulación selectiva (Slattery et al., 2011; Abe et al., 2015).

Además de su papel translocando Exd al núcleo, Hth tiene un homeodominio por el cual se

puede unir al DNA, por lo que también puede tener funciones independientes a Exd (Casares and Mann, 1998; Yao et al., 1999; Azpiazu and Morata, 2000; Azpiazu and Morata, 2002; Salvany et al., 2009; Choo et al., 2011; Slattery et al., 2011; Corsetti y Azpiazu, 2013) o formar trímeros con Exd-Hox, aumentando la longitud de la secuencia diana, y por lo tanto aumentando la especificidad (Ryoo et al., 1999; Popperl et al., 1995; Maconochie et al., 1997; Jacobs et al., 1999; Ryoo et al., 1999; Li-Kroeger et al., 2002; Gebelein et al., 2002; 2004; Ebner et al., 2005,).

1.6.5 Interacciones Hox-Exd fuera del HX

Además de la unión canónica de Exd con las proteínas Hox a través del HX, existen otros dominios de unión en las proteínas Hox. El primero de ellos se descubrió observando que la mutación del HX en la proteína Ubx no afectaba a la represión del dímero Ubx-Exd sobre secuencias reguladoras del gen *Dll* (Merabet et al., 2007). Este resultado indicaba la existencia de otros dominios de interacción en Ubx. El primero en descubrirse fue el motivo UbdA, que se encuentra exclusivamente en las proteínas Ubx y Abd-A de artrópodos, y se localiza C-Terminal al homeodominio (Merabet et al., 2007). Este dominio media el ensamblaje del trímero Ubx/Exd/Hth sobre las secuencias reguladoras de *Dll* (Merabet et al., 2007). Otros motivos conocidos son el motivo TDWM, que se encuentra entre el HX de Abd-A y el homeodominio (Lelli et al., 2011; Hudry et al., 2012), y el motivo RRDR, en Ubx y Abd-A, C-terminal al UbdA (Lelli et al., 2011). Estos motivos tienen una importancia contextual, es decir, se requieren para especificar ciertos caracteres dependientes de Exd pero no otros, y su uso es diferente entre Ubx y Abd-A.

1.6.6 Abd-B y su relación con Hth-Exd

Abd-B tiene una secuencia divergente del resto de las proteínas Hox, por lo que el estudio de los dominios en que Abd-B difiere puede ayudar a entender los mecanismos que confieren especificidad a este factor de transcripción. La conservación de residuos entre proteínas parálogas de distintas especies suele estar asociada a la importancia funcional de los mismos. Una comparación de las proteínas parálogas de Abd-B en artrópodos muestra una conservación en la región N-terminal al homeodominio (EWTGQVS), de la cual el W podría ser homólogo del W central del HX en otras proteínas Hox, formando parte del motivo EWTG, y el resto de residuos (QVS) formar parte del “linker”, que en otras proteínas Hox se ha observado que influye en el efecto de la unión de Exd (Joshi et al., 2007; 2010; Saadaoui et al., 2011). Dentro del homeodominio se encuentra un motivo conservado en el brazo N-terminal (KRKP), que en otras proteínas Hox se ha implicado en la especificidad (Phelan y Featherstone, 1997), especialmente tras la unión de Exd por el HX (Joshi et al., 2007; 2010), y otro grupo de residuos conservados en la hélice III del homeodominio (I47, Q50 y N51), comunes en todas las proteínas Hox. En la región C-terminal después del homeodominio, y cercano a éste, se encuentra el motivo conservado QRQA, con una posición similar a la del motivo UbdA de interacción con Exd de Ubx y Abd-A (Merabet et al., 2007)

(Fig. 9).

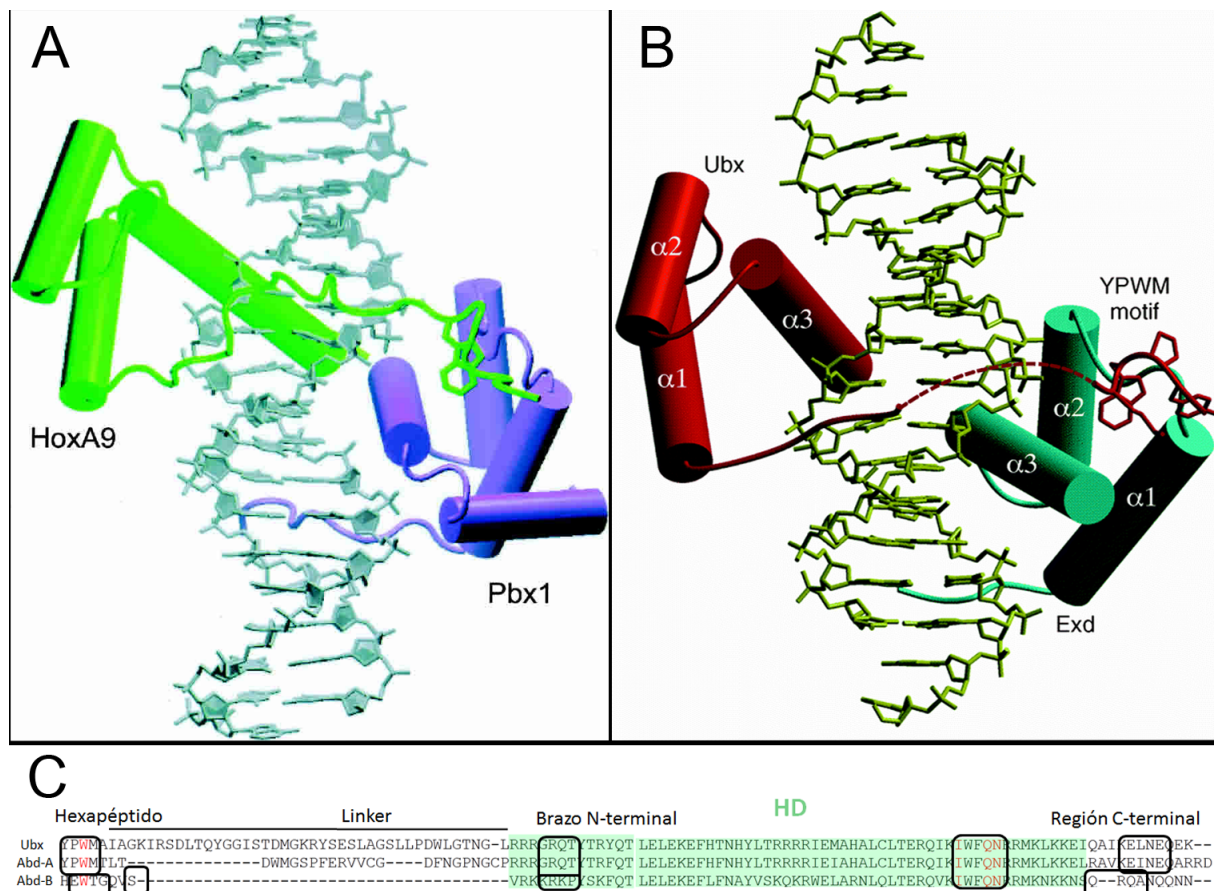


Figura 9. A) Interacción entre el homólogo de Abd-B en ratón, HoxA9 y el homólogo de Exd, Pbx1 por el W conservado del HX. B) Interacción clásica de Ubx con Exd por el HX clásico, YPWM. C) Comparación de motivos conservados de Ubx, Abd-A y Abd-B en la que se indican las diferentes regiones de la proteína (modificado de LaRonde-LeBlanc y Wolberger, 2003; Passner et al., 1999).

En general, se entiende que el papel de Exd y Hth es aumentar la especificidad y la afinidad de las proteínas Hox por el DNA. Sin embargo, también puede ocurrir lo contrario: en experimentos in vitro, la adición de Exd a Abd-B no aumenta su afinidad por el ADN (Van Dijk y Murre, 1994) y reduce su especificidad cuando se compara con Ubx (Slattery et al., 2011). Durante la etapa embrionaria, Abd-B no requiere Exd para la correcta especificación de la región en la que se expresa (Peifer y Wieschaus, 1990), aunque puede ser necesario para la especificación de la banda de dentículos del A8 (Sambrani et al., 2014). *Abd-B* reprime la expresión de *hth-exd* en el embrión (Azpiazu y Morata, 1998; Sambrani et al., 2013; Rivas et al., 2013), por lo que los niveles de Exd y Hth en la región posterior del embrión son muy reducidos. Mientras que Ubx y Abd-A necesitan a Exd/Hth para unirse eficientemente a regiones reguladores del gen *Dll* y reprimir su expresión, Abd-B no los requiere, y su adición impide la unión de Abd-B a estas regiones (Sambrani et al., 2013). Asimismo, la sobreexpresión de Hth o de Exd es capaz de producir un fenotipo similar al de la

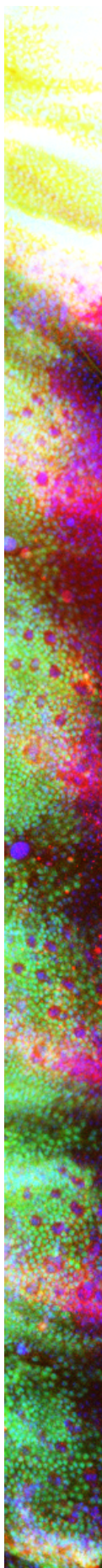
pérdida de *Abd-B*, tanto en el embrión (Rivas et al., 2013) como en el adulto (Ryoo et al., 1999). Los autores han encontrado que este fenómeno no requiere la unión al DNA de Exd, por lo que proponen que está mediado por la unión entre Exd/Hth y Abd-B, si bien no consiguen localizar el dominio responsable. La mutación del W de la región HX de Abd-B no evita el efecto antagónico de Exd/Hth en la unión de Abd-B al DNA *in vitro* (Hudry et al., 2012). Del mismo modo, experimentos de complementación de bifluorescencia con la proteína Abd-B mutada en este W conservado y Exd no muestran cambios en la interacción entre las dos proteínas (Hudry et al., 2012), sugiriendo que el efecto de la proteína Exd sobre la función de Abd-B no está mediada por este residuo.



Figura 10. Esquema de la proteína Abd-B con los dominios Hexapéptido (HX), “Linker” (L), Homeodominio (HD) con el brazo N-Terminal (N), y QRQA (Q).

1.6.7 Otros cofactores de proteínas Hox

Aparte de Exd y Hth, otros cofactores pueden influir en la actividad de las proteínas Hox. Se ha encontrado que el gen de segmentación *en* es capaz de interaccionar *in vitro* con Ubx o con Abd-A para la represión de la región reguladora DMX de *Dll*, aunque no se conoce el dominio de En responsable de dicha interacción (Gebelein et al., 2004). Se ha propuesto igualmente que Teashirt (Tsh), una proteína que pertenece a la familia de los dedos de zinc, funcione como cofactor de las proteínas Hox (Robertson et al., 2004; Taghli-Lamalle et al., 2007), pero no hay evidencias firmes de ello.



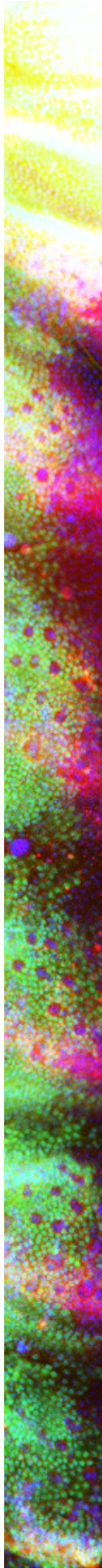
OBJETIVOS

2. Objetivos

En esta tesis se pretende profundizar en el conocimiento de los mecanismos por los que los genes Hox confieren especificidad en los tejidos donde se expresan. Para ello, hemos adoptado una doble metodología.

En primer lugar, deseamos conocer el efecto de distintos motivos y residuos conservados de la proteína Abd-B en su actividad y especificidad. Para ello, hemos utilizado una batería de construcciones de Abd-B con dos tipos de modificaciones: reemplazamientos con alaninas de residuos conservados e intercambios de dichos sitios con las secuencias de Ubx y Abd-A.

En segundo lugar, nos interesa conocer la relación entre Hth, Exd y Abd-B, y caracterizar los mecanismos por los cuales se produce: si actúa como cofactor regulando la actividad de Abd-B, si sus efectos son independientes, o si las dos situaciones coexisten. Para ello, hemos realizado experimentos de inmunoprecipitación, hemos visualizado la interacción entre Abd-B y Exd/Hth *in vivo*, hemos analizado dianas conocidas de Abd-B en el A7, y hemos estudiado su regulación por Hth, Exd y Abd-B.



MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1 Estirpes de moscas mutantes o transgénicas

Silvestres: Vallecas. También se ha utilizado la estirpe *y w* como silvestre.

Alelos *Abd-B m⁻ r⁻*: *Abd-B^{M1}* (Sánchez-Herrero et al., 1985; Casanova et al., 1986) y *Abd-B^{D16}*, que es una deficiencia que elimina el homeodominio y secuencias adyacentes (Hopmann et al., 1995).

Abd-B-199^{LacZ} (Bender y Hudson, 2000) es una inserción de un elemento *P-LacZ* en la región promotora de *Abd-B*, y reproduce aproximadamente su patrón. La inserción produce una mutación hipomorfa para *Abd-B m⁻ r⁺*

hth^{P2} es un alelo fuertemente hipomorfo de *hth* (Sun et al., 1995; Noro et al., 2006)

Las pupas macho (XY) del genotipo *X B^S.Y dsx¹/dsx¹* se han distinguido de sus hermanas XX gracias a la mutación *B^S*, inserta en el cromosoma Y, que reduce el tamaño del ojo.

Q-vg^{LacZ} (Weatherbee et al., 1998) se expresa según el patrón del gen *vestigial (vg)*.

3.2 Expresión ectópica de genes

Hemos utilizado el sistema bipartito Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993). Este sistema utiliza una secuencia activadora (Gal4) y una secuencia de respuesta a ésta (UAS) propias de levaduras. Con este sistema, se generan independientemente líneas de *Drosophila* con inserciones Gal4 que producen patrones de expresión específicos en función de su sitio de inserción en el genoma, y, por otro lado, se generan líneas con la secuencia de respuesta (UAS) seguida de los cDNAs que se deseen expresar ectópicamente. La combinación de los dos elementos en el mismo individuo mediante un cruzamiento permite activar la expresión de un determinado gen. La proteína Gal80 (Lee y Luo, 1999) inactiva a la proteína Gal4 y por tanto bloquea el sistema Gal4/UAS. La proteína Gal80^{ts} no bloquea la proteína Gal4 a 29°C, pero sí que lo hace a 17°C. Mediante cambios de temperatura entre 17 °C y 29 °C se permite así regular la expresión temporal del cDNA controlado por la secuencia UAS (McGuire et al., 2003).

3.2.1 Líneas Gal4

Abd-B-Gal4^{LDN} (de Navas et al., 2006) es una inserción en la región promotora de *Abd-B*, y reproduce aproximadamente su patrón, siendo su expresión mayor en el A8. Su inserción ha producido una mutación hipomorfa para *Abd-B m⁻ r⁺*.

MD761-Gal4 (Foronda et al., 2012) es una inserción en la región reguladora de *Abd-B iab-7*, y dirige la expresión en el segmento A7. Su inserción causa una mutación que reduce fuertemente la expresión de *Abd-B* en el A7.

arm-Gal4 (Sanson et al., 1996). Dirige la expresión de Gal4 de forma ubicua.

MS1096-Gal4 (Capdevila y Guerrero, 1996). Dirige la expresión, principalmente en la zona dorsal del “pouch” del disco imaginal de ala.

3.2.2 Líneas UAS

UAS-*Abd-B M* 1.1 (Castelli-Gair et al., 1994).

Construcciones UAS-*Abd-B* con mutaciones hacia alaninas (>A) o hacia residuos conservados en Ubx y Abd-A (indicados en cada caso), o intercambios de homeodominio (IHD) (Sambrani et al., 2013). Las inserciones en los sitios ZH35 y ZH50 se han realizado por el sistema attP/attB (Groth et al., 2004; Bischof et al., 2007). Tanto la inserción de la proteína silvestre como las mutantes corresponden a la proteína Abd-B M.

UAS-*Abd-B* (ZH35), UAS-*Abd-B*^{W>A} (ZH35), UAS-*Abd-B*^{TG>AA} (ZH50), UAS-*Abd-B*^{EW TG>AAAA} (ZH50), UAS-*Abd-B*^{EW TG>YPWM}, UAS-*Abd-B*^{HxL Ubx} (se substituye el hexapéptido y linker de Abd-B por los de Ubx), UAS-*Abd-B*^{S>A} (ZH50), UAS-*Abd-B*^{KK>AA}, UAS-*Abd-B*^{KRKP>GRQT}, UAS-*Abd-B*^{Q50>A} (ZH50), UAS-*Abd-B*^{N51>A} (ZH35), UAS-*Abd-B*^{I47, Q50, N51>A, A, A} (ZH50), UAS-*Abd-B*^{QR>QAA}, UAS-*Abd-B*^{IHD Ubx}, UAS-*Abd-B*^{IHD abd-A}.

UAS-*GFP* (Ito et al., 1997), UAS-*hth* RNAi (Viena Drosophila RNAi Center, VDRC, 12763 del cromosoma II y 12764 del cromosoma III), UAS-*exd* RNAi (VDRC, líneas 7802 del cromosoma II y 7803 del cromosoma III), UAS-*Abd-B* RNAi (VDRC, línea 12024), UAS-*tra* RNAi (VDRC, línea 2560) UAS-*hth*, UAS-*exd*, UAS-*exd*^{nls} (proporcionados por Natalia Azpiazu). UAS-*Abd-B::VC* y UAS-*VN::Exd* (Hudry et al., 2012)

Los balanceadores CyO, MKRS, TM2 y TM6B, se han utilizado para distinguir adultos, larvas y pupas mutantes.

3.3 Análisis clonal

Hemos utilizado el sistema FLP/FRT (Golic, 1991; Xu y Rubin, 1993) para generar individuos con clones mutantes. En este sistema, se induce la expresión de la flipasa *hs-flp*¹²² con un choque térmico de 1,5 horas a 37°C en larva III. La proteína flipasa produce la recombinación de las secuencias FRT de las cromátidas de cromosomas homólogos, generando, al término de la mitosis, células homocigóticas para el brazo cromosómico en el que se encuentra la secuencia FRT. Los clones (mutantes) se identifican en la cutícula pupal por la pérdida de GFP (que se expresa ubicuamente bajo el control del promotor de la ubiquiti-

na) mientras que los clones gemelos (silvestres) tienen dos dosis de *ubiquitina (ubi)-GFP*, y, por lo tanto, mayor fluorescencia. En adultos mutantes para *yellow (y)*, hemos identificado los clones por este marcador, al perderse el alelo silvestre y^+ .

Como complemento de estos experimentos, hemos utilizado clones de expresión ectópica, que ganan la expresión de Gal4 gracias a la pérdida de un elemento aislante situado entre dos secuencias FRT situadas *en cis* (Struhl y Basler, 1993). En este caso la inducción se ha realizado con un choque térmico de 15 minutos a 37°C a las 0h de pupación. Hemos utilizado este sistema para producir clones mutantes de *Abd-B*, *hth*, y *tra*.

Hemos utilizado los siguientes cromosomas en el análisis clonal:

Para marcar clones en adultos:

FRT82B hs-CD2, y⁺ M(3)w (Abu-Shaar y Mann, 1998)

Para marcar clones en histoblastos:

FRT82B ubi-GFP (Brand, 1999)

FRT82B Abd-B^{M1} (Estrada y Sánchez-Herrero, 2001)

FRT82B Abd-B^{D16} (proporcionado por E. Sánchez-Herrero, CBMSO, Madrid)

FRT82B hth^{P2} (proporcionado por N. Azpiazu, CBMSO, Madrid).

Clones de expresión ectópica

act>y⁺>Gal4 UAS GFP (Ito et al., 1997)

Genotipos de las larvas o pupas en las que se inducen los clones:

Clones *Abd-B⁻*:

y hs-flp¹²²/yw o Y; FRT82B Abd-B^{D16} o FRT82B Abd-B^{M1}/FRT82B ubi-GFP

Clones *hth⁻*:

y hs-flp¹²²/yw o Y; FRT82B hth^{P2}/FRT82B ubi-GFP

y hs-flp¹²²/yw o Y; FRT82B hth^{P2}/FRT82B hs-CD2, y⁺ M(3)w

Clones de expresión ectópica:

y hs-flp¹²²/w o Y; act>y⁺>Gal4 UAS- GFP/UAS-hth RNAi

y hs-flp¹²²/w o Y; act>y⁺>Gal4 UAS-GFP/UAS-Abd-B RNAi

y hs-flp¹²²/w o Y; act>y⁺>Gal4 UAS-GFP/UAS-tra RNAi

3.4 Cuantificación de los niveles de expresión de las líneas UAS-Abd-B

Hemos expresado con la línea *MS1096-Gal4* las construcciones *UAS-Abd-B*, realizando una tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Abd-B en el disco imaginal de ala, y cuantificado sus niveles de expresión con el software ImageJ. Los experimentos se han llevado a cabo en hembras a 17°C, en paralelo y en idénticas condiciones todos ellos. Hemos agrupado a las distintas inserciones en dos grupos comparables entre sí. Este método permite comparar la expresión relativa de las líneas, existiendo en cada uno de los grupos una inserción con la proteína silvestre, que usamos como control. Hemos obtenido los niveles de expresión medios de las inserciones (ZH35) y (ZH50) con tres inserciones distintas en estos loci.

3.5 Análisis de las cutículas adultas

Las moscas adultas se han guardado en una mezcla 3:1 de etanol y glicerol. Para montarlas, se han diseccionado, y se han macerado en una solución al 10% de KOH a 100°C hasta la disolución de las estructuras internas. Las cutículas se montaron en glicerol, añadiéndose una pequeña cantidad de Tween-20 como agente tensioactivo.

3.6 Análisis de las cutículas embrionarias

Protocolo: Se dejan madurar a los embriones hasta el final de la embriogénesis manteniendo una temperatura de 29 °C. Se decorionan mediante una inmersión en lejía durante 2 min. Se lavan con agua abundante y después con heptano. Se añade metanol y se agita el vial que contiene a los embriones durante 20 segundos en un vórtex para desvitelinizar. Se elimina el heptano, y se lava 3 x 10 minutos con metanol. Posteriormente, se lava con el tampón salino PBT (PBS + 0.1% Tritón X-100), se substituye el PBT por Hoyer's-láctico 1:1. Se colocan los embriones con Hoyer's-láctico sobre un portaobjetos. Se cubre con un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire, y se deja incubar durante toda la noche a 60°C.

3.7 Técnicas inmunohistoquímicas

Para realizar tinciones en los discos imaginales, hemos utilizado los métodos clásicos del laboratorio (Foronda et al., 2012). Para teñir el epitelio pupal, hemos utilizado una integración entre los métodos publicados (Wang y Yoder, 2011 y Foronda et al., 2012), junto con algunas aportaciones nuestras. El protocolo es el que sigue: datar las pupas en el

estadio de pupa blanca (comienzo de la pupación). En este momento es muy importante limpiar la parte exterior de la pupa para asegurarse de que no tiene restos de papilla pegados. Para ello, se lavarán en un pocillo dos veces con PBS, frotándolas con un pincel, y se limpiarán individualmente con las pinzas, colocándolas sobre un portaobjetos que se introducirá en la cámara húmeda.

Incubar en una cámara húmeda el tiempo requerido (salvo que se indique lo contrario, hemos utilizado una temperatura de 29°C). Debido a ello, el desarrollo es más rápido que los tiempos de referencia publicados. En nuestros experimentos en machos, a las 20 h. DFP comienzan a fusionarse el T6 y el T7, a las 22h. DFP están parcialmente fusionados y el A7 comienza a reducirse; a las 24h. DFP los segmentos A6 y A7 están totalmente fusionados (aunque puede quedar alguna célula larvaria en algún caso), y el A7 está fuertemente reducido. A las 26h. DFP no queda A7 en los machos ni células larvarias. Detener el desarrollo en el momento deseado cambiando a 4°C. Mantener en la oscuridad a esa temperatura hasta la disección (no más de 48 h.). Todos los pasos que tengan cierta duración se desarrollarán en la oscuridad, con el fin de que la exposición prolongada a la luz no destruya las proteínas fluorescentes o los fluoróforos (como hemos observado que ocurre). Tras 48 h. con el desarrollo detenido a 4°C, las pupas de 18 a 26 h. DFP mantienen la viabilidad si se cambian a 25°C.

Para la disección, se pegan las pupas (10 máximo) a un celofán de doble cara que está adherido a un portaobjetos. Las pupas se dividen longitudinalmente por el eje de simetría izquierda-derecha con una cuchilla de afeitar bajo la lupa binocular. Se despegan añadiendo PBS y se pasan a un pocillo con PBS situado sobre hielo. Se va cogiendo individualmente cada media pupa y se sitúa en una gota de PBS sobre un portaobjetos. Con una pinza afilada se sujeta la pupa por la cabeza, y con la otra se corta la tráquea que conecta el tórax con el abdomen, y que ancla numerosos órganos internos. Seguidamente se lava con PBS el interior de la pupa para expulsar el material interno. Para ello, hay que seguir sujetando la pupa por la cabeza con una pinza, mientras que con la otra mano se maneja una pipeta P-200 con la cual se lanza PBS suavemente. Una vez limpia, la pupa se introduce inmediatamente en un tubo de 1,5 ml. que contiene 200 microlitros de fijador (4% de paraformaldehído, 0.1% DOC y 0.1% de Tritón X-100) que se mantiene en hielo. La fijación se realiza durante toda la noche a 4°C. La mañana siguiente se retira el fijador y se lava 3 x 10min con PBT (PBS, 0.1% de Tritón X-100). Se mantienen las pupas en PBT a 4°C hasta mediodía, cuando se bloquean con PBT + 0.1% BSA durante dos horas a 4°C. Se retira la solución de bloqueo, y se añade el anticuerpo disuelto en PBT + 0.1% BSA. Se incuba toda la noche. La mañana siguiente se retira el anticuerpo y se lava 4 x 15 min con PBT. Se añade el anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo correspondiente, y se incuba 2 horas a temperatura ambiente. Se retira y se lava 4 x 15 min. con PBT. Se añade una gota de medio de montaje Vectashield, dejándose incubar al menos 2 horas. Para el montaje, se separan los

epitelios pupales de la carcasa y se introducen en un surco con Vectashield creado por dos cubreobjetos pegados sobre un portaobjetos. Se tapa con otro cubreobjetos con cuidado de no crear burbujas y se sella con laca.

3.7.1 Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios:

Anti-Abd-B, anti-Wg, anti-Dsx, anti-Sc (producidos en ratón, Hybridoma Bank, Universidad de Iowa), 1:25-1:50. Anti-Bab1 en conejo (Godt et al., 1993), 1:200. Anti-Bab2 en rata (Couderc et al., 2002), 1:200. Anti-Exd en rata (proporcionado por N. Azpiazu, CBMSO, Madrid), 1:200. Anti-Hth en conejo (1:500) y en cobaya (1:300) (obsequio de N. Azpiazu, CBMSO, Madrid), 1:300. Anti-GFP en conejo (Invitrogen), 1:300. Anti-GFP en ratón (Roche), 1:300. Anti β -Galactosidasa en pollo (Abcam), 1:200

3.7.2 Anticuerpos secundarios

Alexa 488, Alexa 555, Alexa 647 de las especies correspondientes (Invitrogen), 1:200. Para el marcaje de los núcleos se ha utilizado To-Pro 3 (Invitrogen), 1:500.

3.7.3 Microscopía confocal

Para la visualización de las preparaciones inmunohistoquímicas en pupas, se ha utilizado un microscopio confocal Leica Microradiance a 20x, y un Zeiss Meta 510 invertido a 25x. Dado que las pupas tienen forma cóncava, se han realizado 25 cortes por pupa, y posteriormente se ha realizado una proyección máxima de estos con el software ImageJ.

3.7.4 Cuantificación de los niveles de expresión de Hth y Abd-B en el epitelio pupal

El protocolo inmunohistoquímico se ha realizado en idénticas condiciones para machos y hembras. Las incubaciones se han realizado en el mismo tubo, marcándose los machos con un corte en los espiráculos de la cabeza. La adquisición de las imágenes se ha realizado en idénticas condiciones, con unos parámetros que evitasen la saturación de los píxeles. Se han cuantificado los niveles de fluorescencia de los terguitos 6 y 7 utilizando el software ImageJ, y se han normalizado respecto a los niveles de marcaje de TOPRO.

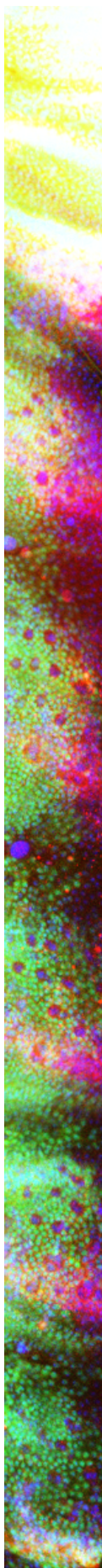
3.8 Complementación de Bifluorescencia

La complementación de Bifluorescencia es un método para analizar interacciones proteína-proteína que se basa en la capacidad de dos fragmentos de una proteína fluorescente (N-terminal o C-terminal), cada uno de ellos unidos a dos proteínas cuya interacción se quiere estudiar, de reconstituir la proteína nativa, y por tanto la fluorescencia, al estar en proximidad. Por lo tanto, si dos proteínas, unidas a estos dos fragmentos, interaccionan *in vivo*, la unión se detectará por la fluorescencia emitida. (Kerppola, 2008). La Complemen-

tación de Bifluorescencia, realizada con el sistema Gal4/UAS, ha sido ensayada con éxito en *Drosophila* (Hudry et al., 2012), y la hemos utilizado para estudiar en el abdomen pupa la posible interacción entre Exd y Abd-B. Las líneas que hemos usado son UAS-Abd-B^{VC} y UAS-Exd^{VN}, en las que Abd-B y Exd se unen a dos fragmentos de la proteína Venus (Hudry et al., 2012), y han sido proporcionadas por Y. Graba (IMDBL, Marsella) y S. Merabet (IGF, Lyon).

3.9 Co-inmunoprecipitación

Los vectores con mutaciones en los aminoácidos indicados son un obsequio de Y. Graba (IBDML, Marsella) (Sambrani et al., 2013), y los de Exd y Hth de A. Saurin (IBDML, Marsella). Los vectores contienen un cDNA que codifica para las siguientes proteínas Hth, Exd o Abd-B fusionadas con epítopos: Flag-Hth, His-Exd, HA-Abd-B, HA-Abd-B^{W>A}, HA-Abd-B^{S>A}, HA-Abd-B^{QR>QAA} y HA-Abd-B^{W>A, QR>QAA}. Se han subclonado por procedimientos convencionales en el vector pFastBac (todos los subclonajes se han secuenciado para comprobar que contenían la mutación adecuada), y se ha seguido el protocolo recomendado por Invitrogen (Bac-to-Bac Expression System) para elaborar vectores baculovirales. Estos se han utilizado para inducir la expresión de las proteínas según el protocolo recomendado. Las células se han recogido mediante centrifugación, se han lavado con PBS frío y se han resuspendido en la solución de lisis (140 mM KCl, 5% glicerol, 2.5% MgCl₂, 25mM Hepes pH 7.8, Inhibidor de proteasas, 10mM imidazol). Los niveles de expresión de las proteínas se han cuantificado mediante Western Blot, tomándose en cuenta esas ponderaciones para realizar las mezclas de Exd-Hth con los diferentes mutantes de Abd-B, añadiendo en los casos que era necesario solución de lisis para obtener en todos los casos el mismo volumen final. Los experimentos de inmunoprecipitación se han realizado en viales de 2 ml, con 200 microlitros de resina anti-Flag (Sigma-Aldrich) y 580 microlitros de extracto. Se ha seguido el protocolo recomendado por la casa comercial para realizar la co-inmunoprecipitación. Los resultados se han visualizado por Western Blot, utilizando como anticuerpos primarios anti-HA en ratón (Sigma-Aldrich), anti-Flag en conejo (Sigma-Aldrich) y anti-His en ratón (Abcam). Los anticuerpos secundarios han sido anti-ratón o anti-conejo acoplados a HRP específicos de cadena ligera de IgG (Jackson). La exposición se hizo utilizando una solución ECL y una película fotográfica.



RESULTADOS

4. Resultados

PARTE I: ANÁLISIS FUNCIONAL DE DOMINIOS DE LA PROTEÍNA ABD-B

4.1.1 Introducción

La proteína Abd-B especifica la identidad de los segmentos A5-A9 en *Drosophila*, que en el adulto dan lugar al abdomen posterior (A5-A7), a la genitalia femenina (A8) y a la genitalia masculina (A9). Recientemente, se ha abordado con gran profundidad el estudio del papel de los dominios conservados en las proteínas Hox (Merabet et al., 2007; Saadaoui et al., 2011; Lelli et al., 2011; Sambrani et al., 2013) y se han identificado diversos motivos relacionados con la especificidad intrínseca de las proteínas, su funcionamiento básico (la unión al ADN), o la interacción con el cofactor Exd y su modulación. En Abd-B, mediante una comparación con las proteínas codificadas por genes parálogos de artrópodos, se han encontrado diferentes motivos conservados (ver punto 1.6 de la Introducción): en la región homóloga al hexapéptido se encuentra la secuencia EWTG, en el linker una S, en el brazo N-terminal del homeodominio la secuencia KRKP, en la hélice III del homeodominio tres aminoácidos de unión al DNA, I47, Q50 y N51, y en la región C-terminal al homeodominio el motivo QRQA (Fig. 1).

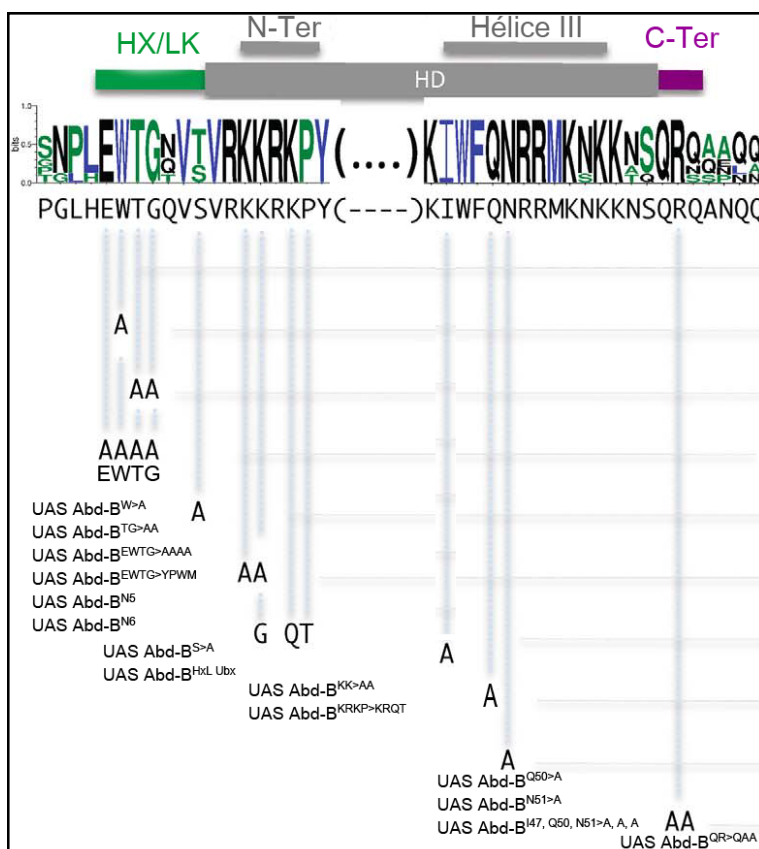


Figura 1: Esquema de la proteína Abd-B con los dominios conservados: el hexapéptido, el linker, el homeodominio, que contiene el brazo N-terminal y la hélice III, y la región C-terminal posterior al homeodominio. Debajo, logotipo de la secuencia de Abd-B con los aminoácidos conservados en artrópodos. Más abajo se muestra la secuencia de *Drosophila* y, en las líneas verticales, las distintas mutaciones a Alaninas (A) de los aminoácidos señalados o los cambios a la secuencia de Ubx y Abd-A. En la parte de arriba se muestran los dominios. En la parte inferior, se detallan las construcciones UAS-Abd-B (Mod. de Sambrani *et al.*, 2013)

El papel de estos residuos ha sido estudiado en el contexto de la represión de *Dll* por Abd-B en la región torácica del embrión, y se ha encontrado que el W y la S no se requieren para esta represión, que los motivos KRKP y QRQA son importantes para la misma, y que los aminoácidos I47, Q50 y N51 son imprescindibles. Sin embargo, esta actividad no requiere Exd (aunque la sobreexpresión de Hth la bloquea) (Sambrani et al., 2013), por lo que no queda claro si estos residuos podrían tener una importancia diferente en la regulación de caracteres que sí que requieren este cofactor.

Decidimos estudiar el papel de los residuos conservados de Abd-B en la actividad de esta proteína sobre diferentes dianas. Las clasificamos de dos maneras diferentes: la primera es en función de si se encuentran reguladas de manera específica por *Abd-B*, como la formación de espiráculos posteriores (EP), la especificación del A7 y la determinación de la genitalia femenina, incluyendo sus dientes vaginales (dianas específicas), o si también pueden ser reguladas por *abd-A* y *Ubx*, como la represión de *Q-vg^{lacZ}* en el disco imaginal de ala (diana genérica). La segunda clasificación es en función de si su morfogénesis (o el control génico) están regulados por Exd-Hth o no: la represión de *Q-vg^{lacZ}* la analizamos en el “pouch” del disco imaginal de ala, en donde *hth* no se expresa y Exd se encuentra inactivo (Rauskolb et al., 1995; Ryoo et al., 1999). La inducción de EP no requiere Exd-Hth, y ocurre en una región en donde *hth* se encuentra reprimido; sin embargo, se bloquea con la expresión ectópica de Hth (Rivas et al., 2013). Por el contrario, la morfogénesis del abdomen posterior requiere *exd*, ya que en los machos la mutación de este gen provoca el desarrollo de un pequeño A7 (Rauskolb et al., 1995), y en las hembras la falta de *hth* produce dientes vaginales extra (Estrada y Sánchez-Herrero, 2001).

Para el estudio de la función de los distintos aminoácidos o dominios de la proteína Abd-B se han modificado los mismos (Fig. 1), expresado mediante el sistema Gal4/UAS las proteínas mutantes y analizado la expresión génica o morfología resultante. Puesto que varias de las inserciones P-UAS de las proteínas mutantes no se encuentran insertadas en la misma posición del cromosoma, y debido a los posibles efectos de posición que pueden modificar la cantidad de proteína sintetizada, hemos cuantificado los niveles de expresión de las distintas variantes de *UAS-Abd-B* (ver Materiales y Métodos), y las hemos organizado en dos grupos, uno con niveles de expresión bajos, para el que utilizamos como control la inserción *UAS-Abd-B* (ZH35), y otro con niveles altos, para el que utilizamos como control *UAS-Abd-B* (1.1) (ambas proteínas Abd-B silvestres). Los resultados de estas mediciones se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de expresión de las distintas proteínas Abd-B cuando se expresan en el disco imaginal de ala con la línea *MS1096-Gal4*.

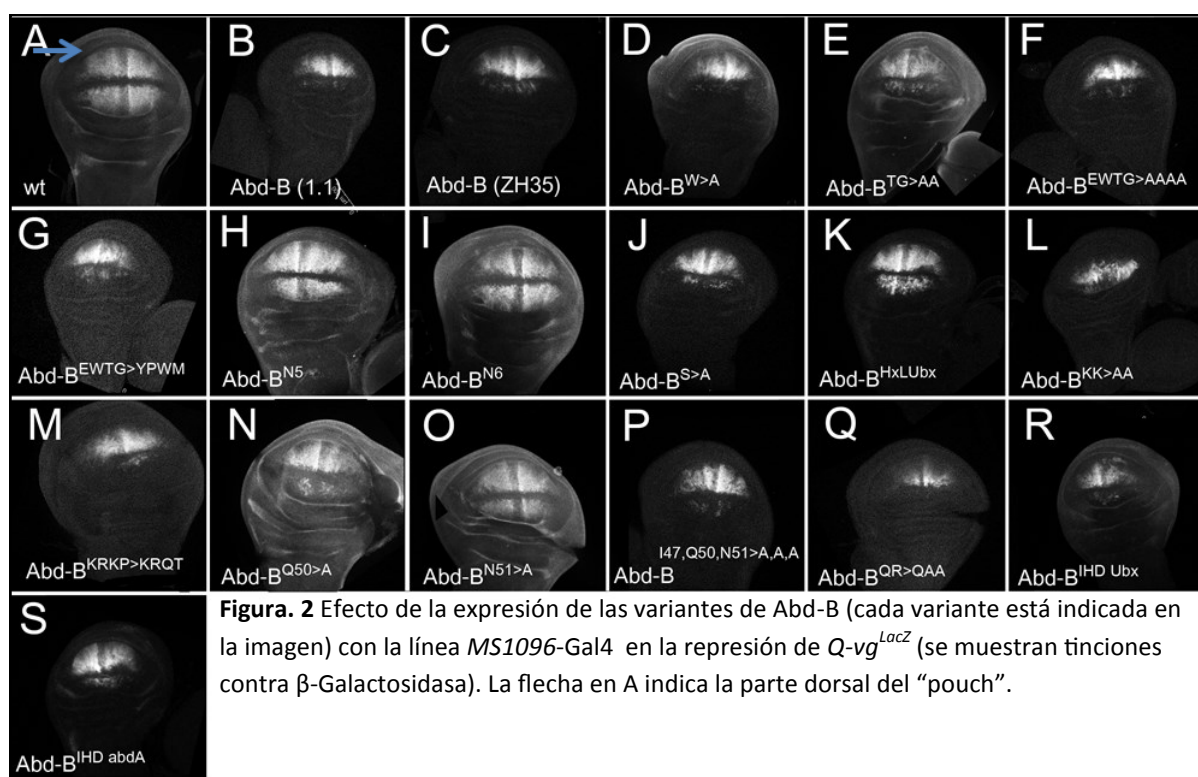
Línea	Media	Desviación standard
<i>Abd-B (1.1)</i>	104	16
<i>Abd-B^{TG>AA} (ZH50)</i>	100	22
<i>Abd-B^{EWGTG>AAAA} (ZH50)</i>	100	22
<i>Abd-B^{EWGTG>YPWM}</i>	104	24
<i>Abd-B^{S>A} (ZH50)</i>	100	22
<i>Abd-B^{KK>AA}</i>	96	24
<i>Abd-B^{KRKP>KRQT}</i>	88	16
<i>Abd-B^{Q50>A} (ZH50)</i>	100	22
<i>Abd-B^{QR>QAA}</i>	98	16
<i>Abd-B^{IHD Ubx}</i>	93	21

Línea	Media	Desviación standard
<i>Abd-B (zh35)</i>	63	16
<i>Abd-B^{W>A} (ZH35)</i>	63	16
<i>Abd-B^{N5} (ZH35)</i>	63	16
<i>Abd-B^{N6} (ZH35)</i>	63	16
<i>Abd-B^{HxL Ubx} (ZH35)</i>	65	10
<i>Abd-B^{N51>A} (ZH35)</i>	63	16
<i>Abd-B^{I47, Q50, N51>A, A, A} (ZH35)</i>	63	16
<i>Abd-B^{IHD Abd-A} (ZH35)</i>	63	16

4.1.2 Represión de Q-vg en el disco imaginal de ala

Todos los genes Hox del C-BX son capaces de reprimir el desarrollo del ala, transformándola en un halterio en mayor o menor medida (Casares et al., 1996; de Navas et al, 2006). Existen diversos genes necesarios para el desarrollo del ala y que no se expresan en el disco de halterio, que se pueden utilizar para cuantificar el grado de actividad de Abd-B cuando expresamos dicho gen ectópicamente en el disco imaginal de ala. En nuestro estudio hemos utilizado un indicador del gen *vestigial*, *Q-vg^{lacZ}*, que se expresa tanto en la región dorsal como en la ventral del “pouch” del disco imaginal de ala. Hemos expresado en el disco de ala, a 17 °C, las variantes de Abd-B con la línea *MS1096-Gal4*, que dirige la expresión predominantemente en la región dorsal, y cuantificado los niveles de expresión del indicador *Q-vg^{lacZ}* respecto a la región ventral (ver Materiales y Métodos). En la Figura 2 se pueden observar discos imaginales del genotipo *MS1096-Gal4 /+; UAS Abd-B*/Q-vg^{lacZ}*

teñidos con anti- β -Galactosidasa, y en la Tabla 2 se muestra la cuantificación de la expresión de esta proteína (ver Materiales y Métodos). Las construcciones UAS-*Abd-B* (ZH35), UAS-*Abd-B* (1.1), UAS-*Abd-B*^{W>A}, UAS-*Abd-B*^{EWGTG>AAAA}, UAS-*Abd-B*^{TG>AAAA}, UAS-*Abd-B*^{EWGTG>YPWM}, UAS-*Abd-B*^{S>A}, UAS-*Abd-B*^{KK>AA}, UAS-*Abd-B*^{KRKP>GRQT}, UAS-*Abd-B*^{Q50>A}, UAS-*Abd-B*^{I47, Q50, N51>A, A, A}, UAS-*Abd-B*^{QR>QAA}, UAS-*Abd-B*^{IHD Ubx} y UAS-*Abd-B*^{IHD Abd-A} reprimen *Q-vg*^{lacZ} de forma total, presentando una expresión de β -galactosidasa menor del 10% con respecto al control (*MS1096/+*; *Q-vg*^{lacZ}/+). La expresión de la construcción con el Hx y “linker” de Ubx, UAS-*Abd-B*^{HxL Ubx}, da lugar a un 25% de la expresión control, UAS-*Abd-B*^{N5} a un 74%, UAS-*Abd-B*^{N6} a un 96%, y UAS-*Abd-B*^{N51>A} a un 91% de expresión respecto al control (ver Tabla 2).



4.1.3 Rescate del fenotipo mutante Abdominal-B en el segmento séptimo abdominal (A7)

4.1.3.1 Introducción

El segmento A7 se elimina durante la pupación en machos, mientras que en hembras se reduce respecto al segmento anterior. Como se mostró anteriormente (Fig. 5 de la Introducción) los segmentos abdominales posteriores de machos y hembras poseen características únicas de tamaño, pigmentación, número de tricomas, etc. que permiten valorar el grado de funcionamiento de las proteínas Abd-B mutantes. Para estudiar la actividad de las

variantes de Abd-B en este segmento hemos utilizado el método de las sustituciones funcionales.

4.1.3.2 Método de las sustituciones funcionales

Este sistema consiste en la expresión mediante el sistema GAL4/UAS de una determinada proteína sobre un fondo mutante del mismo gen que codifica dicha proteína, lo cual permite analizar hasta que punto las proteínas mutantes (o proteína de otras especies) pueden rescatar el fenotipo de falta de función del gen. El patrón de expresión de la línea Gal4 debe ser lo más parecido posible al del gen que se quiere estudiar, y para ello se disponen de diversas líneas Gal4 que reproducen el patrón de expresión de un gen y que, además, son mutantes para el mismo. Esto permite observar la función de la proteína exógena en ausencia (o con muy bajos niveles) de la endógena (ver, por ejemplo, Rincón-Limas et al., 1999; de Navas et al., 2006). Los reemplazamientos funcionales se han realizado en el segmento A7 de los machos y en la genitalia de las hembras.

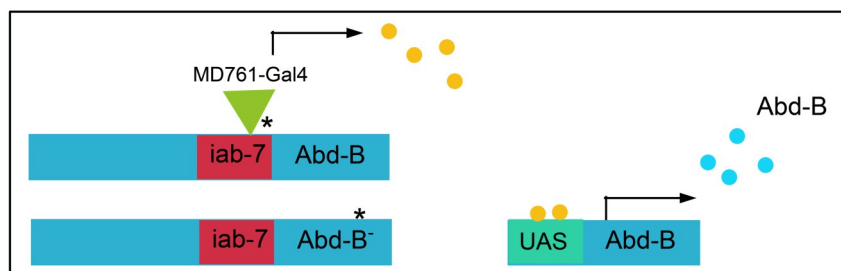


Figura 3. Método de sustituciones funcionales. La combinación *MD761-Gal4* /*Abd-B^{M1}* reduce *Abd-B* en A7 y transforma A7 en A6. La inserción P-Gal4 provoca una mutación en la región reguladora *iab-7* (asterisco) de forma que la expresión de *Abd-B* se reduce en el A7. La mutación *Abd-B^{M1}* elimina *Abd-B* (asterisco). La expresión dirigida por la línea Gal4 en el A7 permite expresar variantes de proteínas *Abd-B* y estudiar el grado de rescate del fenotipo mutante.

Para el estudio de la funcionalidad de las proteínas mutantes en el desarrollo del segmento A7, hemos utilizado la línea *MD761-Gal4* (M. Calleja y G. Morata, comunicación personal; Foronda et al., 2012) (Fig. 6 de la Introducción) (en lo sucesivo, 761-Gal4), que dirige la expresión de construcciones UAS en el parasegmento 12 (A6p-A7a, a partir de ahora denominado A7, ya que el compartimento A6p apenas es visible en el adulto) y algunas células posteriores (Foronda et al., 2012). El patrón de expresión de esta línea se debe a una inserción en la región reguladora de *Abd-B* *infraabdominal-7* (*iab-7*) (posición 3R:12,725,043 y 3R:12,725,044, Flybase). En trans-heterocigosis con un mutante *Abd-B*, dicha inserción afecta a la función de la zona reguladora *iab-7* y provoca una expresión de *Abd-B* en este segmento menor que la de individuos silvestres, semejante a la del A6, y causa por tanto una transformación casi completa de aquel segmento en éste. La combinación de esta línea con el alelo nulo *Abd-B^{M1}*, permite así reemplazar parte de la proteína endógena por la producida por el sistema *Gal4/UAS*, permitiendo de esa manera el análisis

del efecto las diferentes construcciones *UAS-Abd-B* en el rescate del fenotipo (Fig. 3).

4.1.3.3 Fenotipos silvestre y mutante *761-Gal4/Abd-B^{M1}*

En machos con el fondo genético *761-Gal4/Abd-B^{M1}* (Fig. 4B) el A7 sufre una transformación hacia anterior: el T7 se desarrolla, está pigmentado y solo tiene tricomas en la banda anterior, asemejándose al T6 (comparar con el fenotipo silvestre en 4A). El E7 se desarrolla y no tiene cerdas, siendo igualmente similar al E6 silvestre. El T6 es silvestre, mientras que el E6 gana unas pocas cerdas debido al efecto haploinsuficiente del locus *Abd-B*. El A5 es de fenotipo silvestre. En hembras con el fondo genético *761Gal4/Abd-B^{M1}* (Fig. 10L, comparar con el fenotipo silvestre en 10K), el A7 también sufre una transformación hacia A6. Los hemiterguitos del T7 se fusionan y aumentan de tamaño. Los tricomas pasan de ser laterales a cubrir toda la banda anterior. La pigmentación pasa de ser lateral a cubrir la banda posterior del terguito. El E7 aumenta de tamaño, gana cerdas, y cambia su morfología, haciéndose más ancho en vez de más alargado.

4.1.3.4 Rescate del fenotipo mutante

Hemos analizado si la expresión de la proteína Abd-B silvestre es capaz de rescatar el fenotipo mutante *761-Gal4/AbdB^{M1}* (Fig. 4B, comparar con el silvestre en 4A). La expresión de la construcción *UAS-Abd-B-M* (1.1) sobre el fondo mutante (Fig. 4C) provoca, en los machos, que el A7 desaparezca, si bien persisten cuerpos de apariencia necrótica localizados entre el A6 y la genitalia. La pigmentación y los tricomas se restringen a una banda lateral, pero el efecto es más marcado que en el silvestre. El E7 se reduce y disminuye su número de cerdas más que el silvestre. La expresión de la construcción *UAS-Abd-B* (ZH35B) causa una reducción significativa del tamaño del T7 en los machos (Fig. 4D), mientras que el E7 no se desarrolla.

4.1.3.5 Efecto de las variantes de Abd-B en la morfogénesis del séptimo segmento abdominal

Para determinar el grado de rescate del fenotipo hemos utilizado una medida indirecta del tamaño del A7, la medida del número de quetas en el terguito, comparándola con la obtenida en el fondo mutante. Este número es proporcional al tamaño porque hemos observado que su densidad permanece constante en los distintos genotipos. Para que no resultara reiterativo expresar el número de cerdas en la descripción de cada combinación genética, se expresan todas (al igual que otros caracteres medidos, para una mejor comparación) en la Tabla 2 al final de este capítulo.

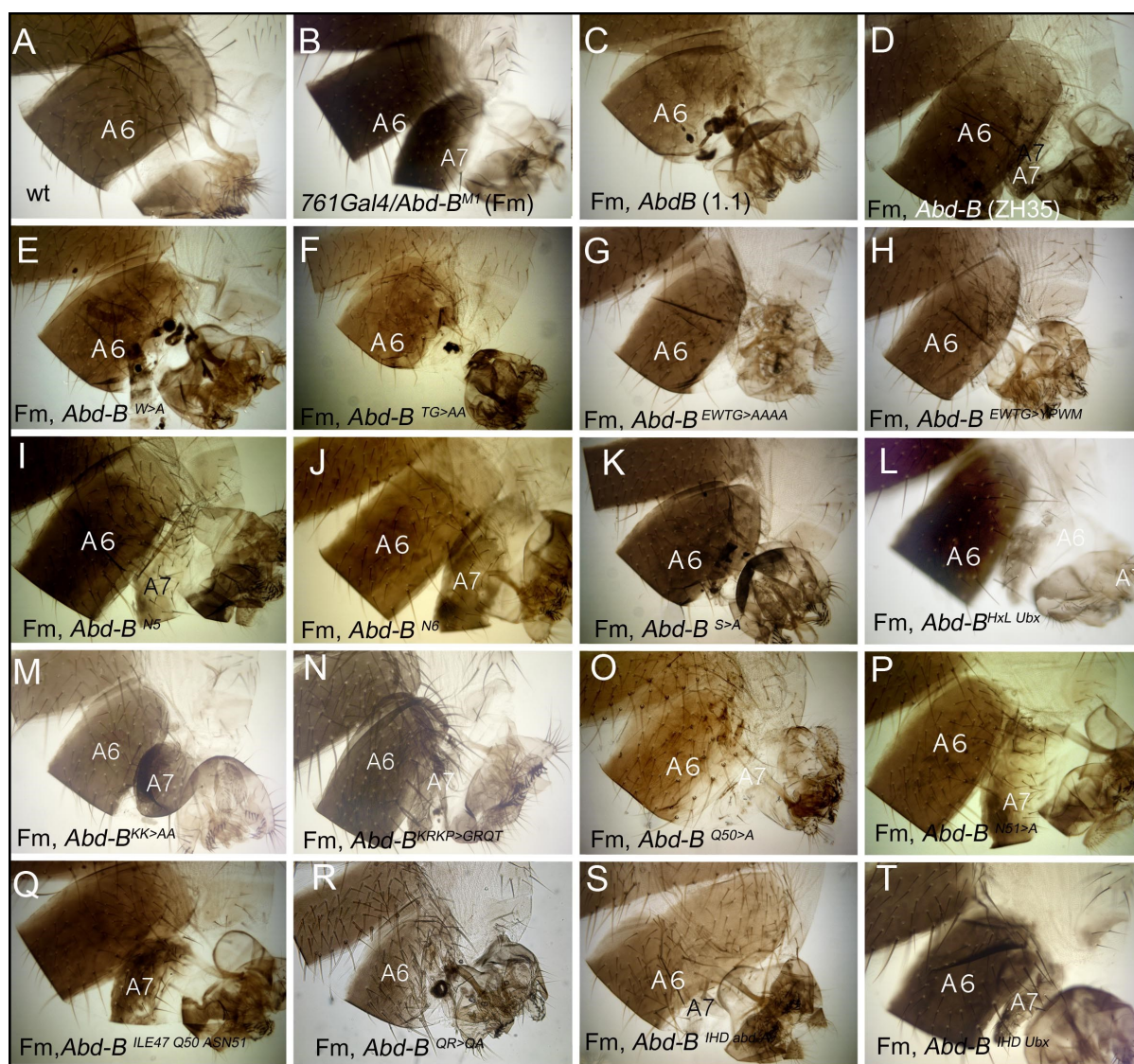


Figura 4. Efecto de las variantes de *Abd-B* en la morfogénesis del A7 de machos. El genotipo es *UAS-Abd-B*/+; 761-Gal4/Abd-B^{M1}*. Las variantes de *Abd-B* utilizadas están indicadas en cada imagen. (Fm) indica el fondo mutante (*761-Gal4/Abd-B^{M1}*) en el que se expresan todas las variantes. wt= fenotipo silvestre.

4.1.3.5.1 Región del Hexapéptido (HX)

Las construcciones con mutaciones a Alaninas (>A) en la región homóloga al hexapéptido (W>A, TG>AA, EWTG>AAAA), y el intercambio de EWTG con YPWM (el motivo HX del resto de proteínas Hox), son capaces de rescatar el fenotipo mutante de un modo similar al rescate control (Figs. 4E-H) (Tabla 2). El séptimo segmento de los machos desaparece completamente, y sólo quedan unos pequeños restos aparentemente necrosados en algunos casos.

La construcción con la proteína *Abd-B* que incluye la delección N5 (delección de la región N-terminal, conservando la región similar al hexapéptido) produce un rescate reducido, mientras que la que incluye la delección N6 (delección N-terminal incluyendo la región

similar al Hexapéptido) no produce rescate (ver Tab. 2, Fig. 4I, J). La primera construcción reprime parcialmente la pigmentación mientras que la proteína que incluye la delección N6 no lo hace. El número de tricomas guarda relación con el tamaño del A7, siendo más numerosos en la segunda proteína que en la primera.

4.1.3.5.2 Región del “linker”

La expresión de la construcción *UAS-Abd-B^{S>A}* (Fig. 4K) es capaz de rescatar el fenotipo mutante de manera similar al rescate control de *UAS-Abd-B-M* (1.1) (Fig. 4C): el A7 de los machos desaparece completamente, y sólo quedan unos pequeños restos aparentemente necrosados (Tabla 2). La expresión de la construcción *UAS-Abd-B^{HxL Ubx}* produce un rescate parcial, generando un T7 y E7 con un tamaño reducido (Fig. 4L), con el número de tricomas reducido de modo similar. La pigmentación no se ve afectada.

4.1.3.5.3 Región del brazo N terminal del homeodominio

El rescate con las construcciones *UAS-Abd-B^{KRKP>KAKP}* o *UAS-Abd-B CEN^{KRKP>GRQT}* en las mismas condiciones que el resto de las variantes, provoca la muerte en los estadios tardíos de la pupación, a pesar de que sus niveles de expresión son similares a los de su rescate control *UAS-Abd-B* (1.1). Para intentar solventar este problema y obtener individuos adultos, hemos cambiado las condiciones para conseguir niveles de expresión más bajos. Hemos utilizado un recombinante de la línea *MD761-Gal4, mwh jv MD761-Gal4*, que aparentemente proporciona niveles más bajos de expresión de la proteína Gal4, y hemos rebajado la temperatura hasta 17°C. En esas condiciones, hemos podido obtener solo unos pocos “escapers”. El rescate control con la construcción *UAS-Abd-B-M* (1.1), con estas condiciones, produce un rescate total del A7, aunque persisten unos restos de tejido de apariencia necrosada (no mostrado). En las mismas condiciones, la expresión de *UAS-Abd-B^{KRKP>KAKP}* o *UAS-Abd-B CEN^{KRKP>GRQT}* producen un rescate parcial del A7 (Fig. 4M, N) (ver Tabla 2). En el rescate con *UAS-Abd-B^{KRKP>GRQT}* no hemos encontrado un cambio hacia la identidad de Ubx (segmento A1), como quizás sería esperable ya que estamos cambiando el motivo de Abd-B por el de Ubx, aunque los casos son insuficientes para extraer una conclusión firme.

4.1.3.5.4 Hélice III del homeodominio

La expresión de la construcción *UAS-Abd-B^{Q50>A}* produce un A7 de tamaño ligeramente menor que el mutante (Fig. 4O, Tab. 2). El T7 no está pigmentado, y el número de tricomas se encuentra reducido. El rescate con la construcción *UAS-Abd-B^{N51>A}* no rescata

el fenotipo mutante (Fig. 4P). El fenotipo con la construcción *UAS-Abd-B*^{I47, Q50, N51>A, A, A} (Fig. 4Q) es un rescate parcial (Tabla 2), y se produce una ligera despigmentación. La distribución de tricomas en el T7 y la morfología del esternito son semejantes a los del fondo mutante (ver Tabla 2).

4.1.3.5.5 Región C-terminal adyacente al homeodominio

La expresión de *UAS-Abd-B*^{QRQA>QAQA} (Fig. 4R) es capaz de rescatar la formación del A7 de un modo similar al rescate control (1.1) (Fig. 4C) (Tabla 2).

4.1.3.5.6 Intercambios de homeodominio con Ubx y Abd-A

La expresión de las construcciones *UAS-Abd-B*^{IHD Abd-A} o *UAS-Abd-B*^{IHD Ubx} produce un rescate parcial del fenotipo mutante (Fig. 4S, T) (ver Tabla 2).

4.1.4 Reemplazamientos funcionales en el A8 (genitalia femenina)

4.1.4.1 Introducción

Para el estudio de la funcionalidad de las proteínas Abd-B mutantes en el desarrollo de la genitalia femenina, hemos utilizado la línea *Abd-B-Gal4*^{LDN}, que dirige la expresión en la misma región que la proteína Abd-B-M, pero con mayores niveles de expresión en el octavo segmento abdominal (A8), el metámero que da lugar a la genitalia femenina (de Navas et al., 2006), que en los segmentos A5-A7. El patrón de expresión de esta línea se debe a una inserción de un elemento *P-Gal4* en la región reguladora de *Abd-B*, lo que ha dado lugar a un alelo fuertemente hipomorfo de este gen (de Navas et al., 2006). En la combinación *Abd-B-Gal4*^{LDN}/*Abd-B*^{M1} no se forma la genitalia, y estudiamos el rescate de este fenotipo contando el número de dientes vaginales que se forman (ver Tabla 2).

4.1.4.2 Morfología silvestre de la genitalia femenina

La genitalia femenina está formada por dos placas esclerotizadas, dispuestas simétricamente a lo largo del eje anteroposterior del animal, y una fila de dientes vaginales que las bordean, flanqueando la abertura de la vagina (Fig. 5A). Los dientes vaginales son que-
tas modificadas, más cortas y gruesas que las normales.

4.1.4.3 Fenotipo del fondo mutante en la genitalia femenina

La combinación genética *Abd-B-Gal4^{LDN}/Abd-B^{M1}* es el fondo mutante en el que expresamos las variantes de la proteína Abd-B. En dicho fondo mutante, las placas genitales y los dientes vaginales se pierden, y se produce un esternito con unas pocas cerdas, sugiriendo una transformación hacia un segmento anterior. El T8 y el A7 sufren también transformaciones parciales hacia segmentos anteriores (Fig. 5B).

4.1.4.4 Rescate del fondo mutante con *UAS-Abd-B*

Hemos comprobado primero si la expresión de la proteína Abd-B silvestre era capaz de rescatar el fenotipo mutante de la combinación *Abd-B-Gal4^{LDN}/Abd-B^{M1}*. La expresión de la construcción *UAS-Abd-B* (1.1) sobre el fondo mutante provoca la reaparición de las placas genitales y algunos dientes vaginales (Fig. 5C). La expresión de la construcción *UAS-Abd-B* (ZH35), sobre el mismo fondo genético no produce rescate de las placas genitales ni de los dientes vaginales (Fig. 5D).

4.1.4.5 Reemplazamientos funcionales con las variantes de Abd-B**4.1.4.5.1 Región similar al hexapéptido**

La expresión de las construcciones *UAS-Abd-B^{W>A}* y *UAS-Abd-B^{TG>AA}* (Figs. 5E, F) rescata el fenotipo mutante mejor que los rescates control, formándose más dientes vaginales. La expresión de la construcción *UAS-Abd-B^{EW TG>AAAA}*, en cambio, no es capaz de producir dientes vaginales (Fig. 5G), pero la proteína *Abd-B^{EW TG>YPWM}* produce un rescate similar al control (Fig. 5H). La expresión de las construcciones *UAS-Abd-B^{N5}* y *UAS-Abd-B^{N6}* no produce ningún rescate (ver Tabla 2).

4.1.4.5.2 Región del “linker”

La proteína *Abd-B^{S>A}* no es capaz de rescatar el fenotipo mutante, no produciéndose ningún diente vaginal, al contrario que su control *Abd-B* (1.1) (Fig. 5K). La expresión de la construcción *UAS-Abd-B^{HxL Ubx}*, en cambio, produce numerosos dientes vaginales, mientras que su control *Abd-B* (ZH34) no produce ninguno (Fig. 5L). Estos dientes vaginales no se encuentran bien alineados, y tienen una morfología característica: son de un tamaño variable, siendo los más anteriores más cortos y presentando, sobre todo los posteriores, un fenotipo intermedio entre diente vaginal y queta (ver Tabla 2)

4.1.4.5.3 Región del brazo N-terminal del homeodominio

La expresión de la construcción *UAS-Abd-B^{KK>AA}* es capaz de rescatar el fenotipo mu-

tante de la genitalia femenina de un modo similar a su rescate control *Abd-B* (1.1) (Fig. 5M). La expresión de la construcción *UAS-Abd-B^{KRKP>GRQT}*, por el contrario, no produce rescate alguno (Fig. 5N, Tab. 2).

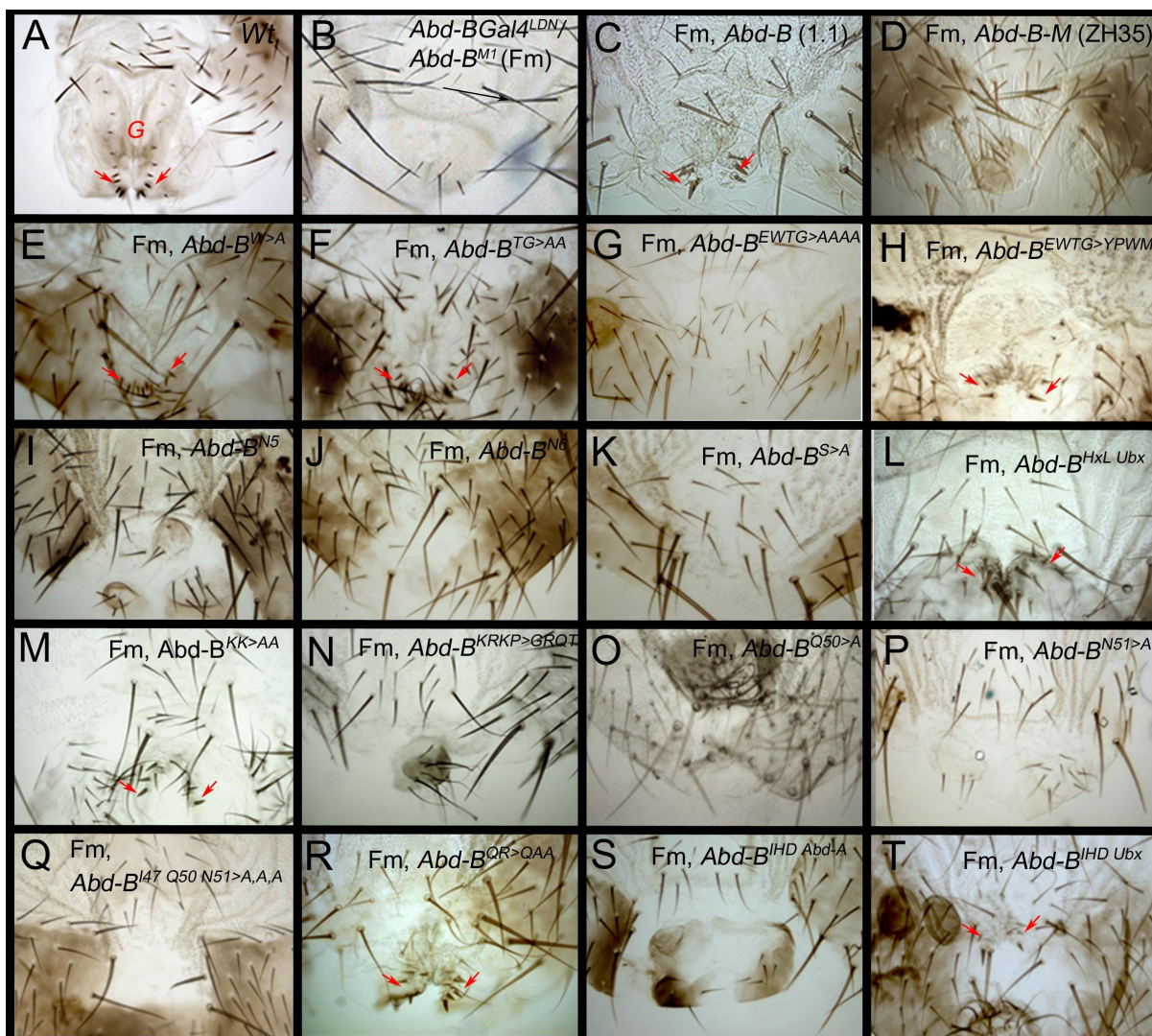


Figura 5. Efecto de las variantes de *Abd-B* en la morfogénesis de la genitalia femenina. Los genotipos son *UAS Abd-B*/+; Abd-BGal4^{LDN}/Abd-B^{M1}*. En cada imagen se indica la variante de *Abd-B* utilizada. Las flechas rojas indican algunos dientes vaginales. En el panel A se marca la genitalia (G).

4.1.4.5.4 Región central de la hélice III del homeodominio

La expresión de las proteínas *Abd-B^{Q50>A}*, *Abd-B^{N51>A}* o *Abd-B^{I47, Q50, N51>A, A, A}* no es capaz de rescatar la formación de la genitalia femenina, no produciéndose placas vaginales ni dientes vaginales (Figs., 5O-Q). En el caso de la mutación N51 (Fig. 5P), en el lugar de la genitalia aparece un esternito, que en algunos casos está dividido en dos (Tabla 2).

4.1.4.5.5 Región C-terminal adyacente al homeodominio

La expresión de la construcción *UAS-Abd-B^{QR>QA}* es capaz de rescatar la genitalia femenina, generando más dientes vaginales que el rescate control aunque no se ha hecho un análisis estadístico para ver si la diferencia es significativa (Fig. 5R). Los dientes vaginales tienen la misma morfología que los silvestres o que los del rescate control, pero tienen una disposición menos ordenada (Tabla 2).

4.1.4.5.6 Efecto de proteínas Abd-B con homeodominios de Ubx o Abd-A

La expresión de *UAS-Abd-B^{IHD Abd-A}* no es capaz de rescatar ni las placas ni los dientes vaginales, y produce un esternito pigmentado en sus bordes (Fig. 5S). La expresión de *UAS-Abd-B^{IHD Ubx}* produce un ligero rescate del fenotipo mutante, con unas placas vaginales amorfas y un número reducido de dientes vaginales no ordenados (Tabla 2). Además, hemos ensayado una inserción diferente de *Abd-B^{IHD Ubx}* que genera numerosos dientes vaginales (no mostrado).

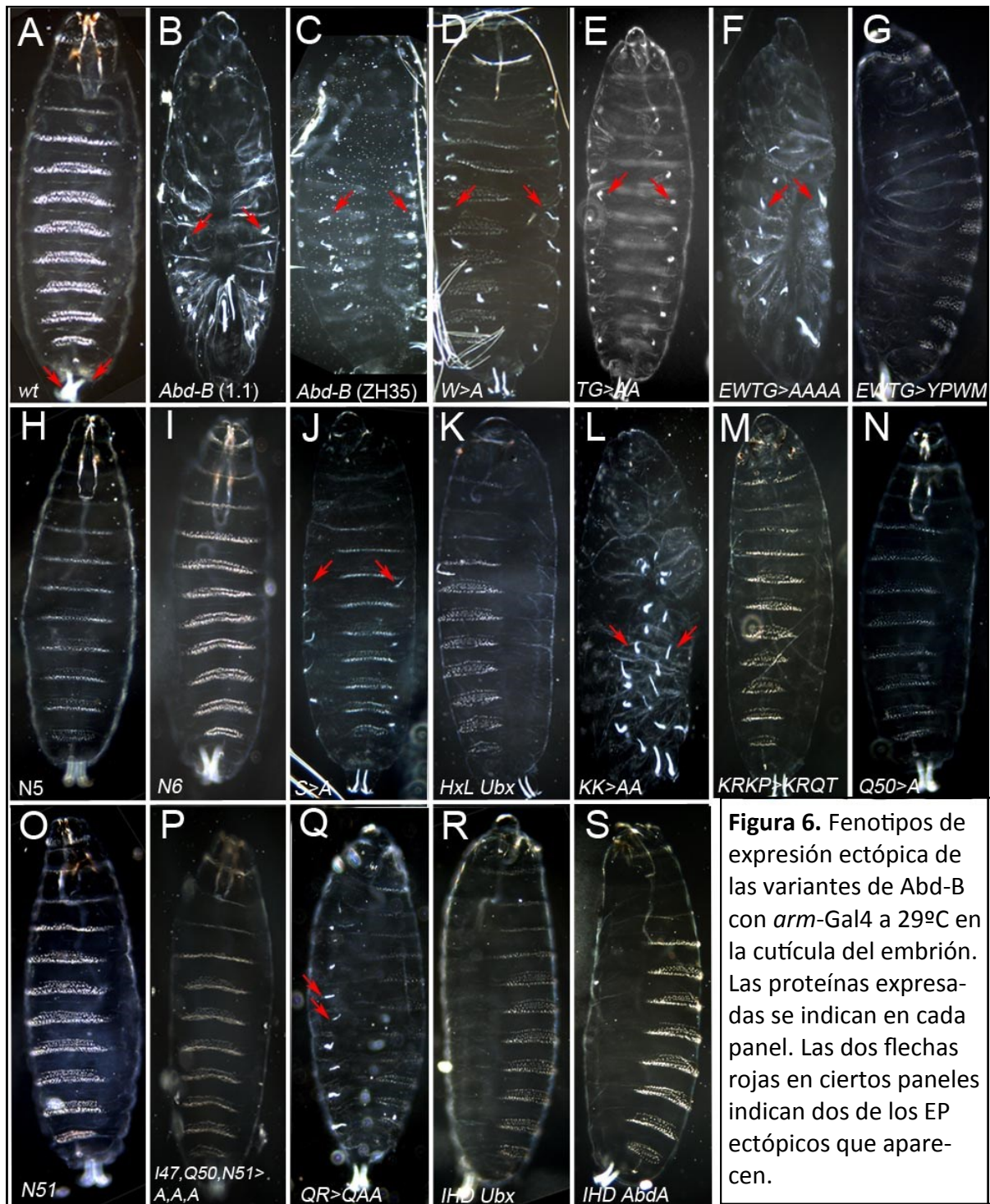
4.1.5. **Expresión ectópica de las variantes de la proteína Abd-B en el embrión**

4.1.5.1 Morfología de la cutícula embrionaria

El embrión de *Drosophila melanogaster* está formado por una región cefálica, una región torácica, dividida en tres segmentos, y una región abdominal, dividida en 10 segmentos (Lohs-Schardin et al., 1979). Tanto los segmentos cefálicos como los segmentos A9 y A10 no son fácilmente distinguibles en la cutícula embrionaria, como sí lo son el resto.

La morfología de la cutícula permite diferenciar la mayor parte de las diferentes regiones y segmentos del embrión. La región cefálica está formada por la fusión de diferentes segmentos y presenta diferentes estructuras características que no se detallan. La región torácica está dividida en tres segmentos. En su región ventral, cada segmento cuenta con una banda de dentículos ventrales, un par de órganos de Keilin, que son órganos sensoriales asociados a los discos imaginales de pata (Keilin, 1915; Cohen et al., 1991) y un par de “puntos negros”, órganos sensoriales campaniformes (Hertweck, 1931). Los dentículos ventrales torácicos tienen una morfología característica, son unas espículas de base estrecha (Lohs-Schardin et al., 1979). Además, el segmento protorácico tiene una banda de dentículos adicional, de tamaño reducido, llamada “barba” y algunos dentículos más gruesos que el resto de los segmentos torácicos (Figs. 6A y 7A). La región abdominal también está dividida en segmentos. Ventralmente, cada segmento (salvo el A9 y el A10) tiene una banda de dentículos abdominales, más grandes que los torácicos y con una base más ancha (Lohs-Schardin et al., 1979). La banda de dentículos del A1 es estrecha, la de los segmentos

A2-A7 son trapezoidales, y la del A8 es rectangular. En el abdomen no hay ni órganos de Keilin, ni “puntos negros”. Dorsalmente, en el A8 hay un par de espiráculos posteriores (EP) fusionados, formando una estructura compleja que forma la apertura al exterior del sistema traqueal del embrión (Manning y Krasnow, 1993). Los componentes principales de esta estructura, de interior a exterior, son el “filzkörper”, un túbulo refringente que es la continuación de la tráquea, el estígmatoforo, la estructura que recubre al “filzkörper”, y los pelos espiraculares, que rodean la abertura del “filzkörper” (Lohs-Schardin et al, 1979) (Fig. 6A).



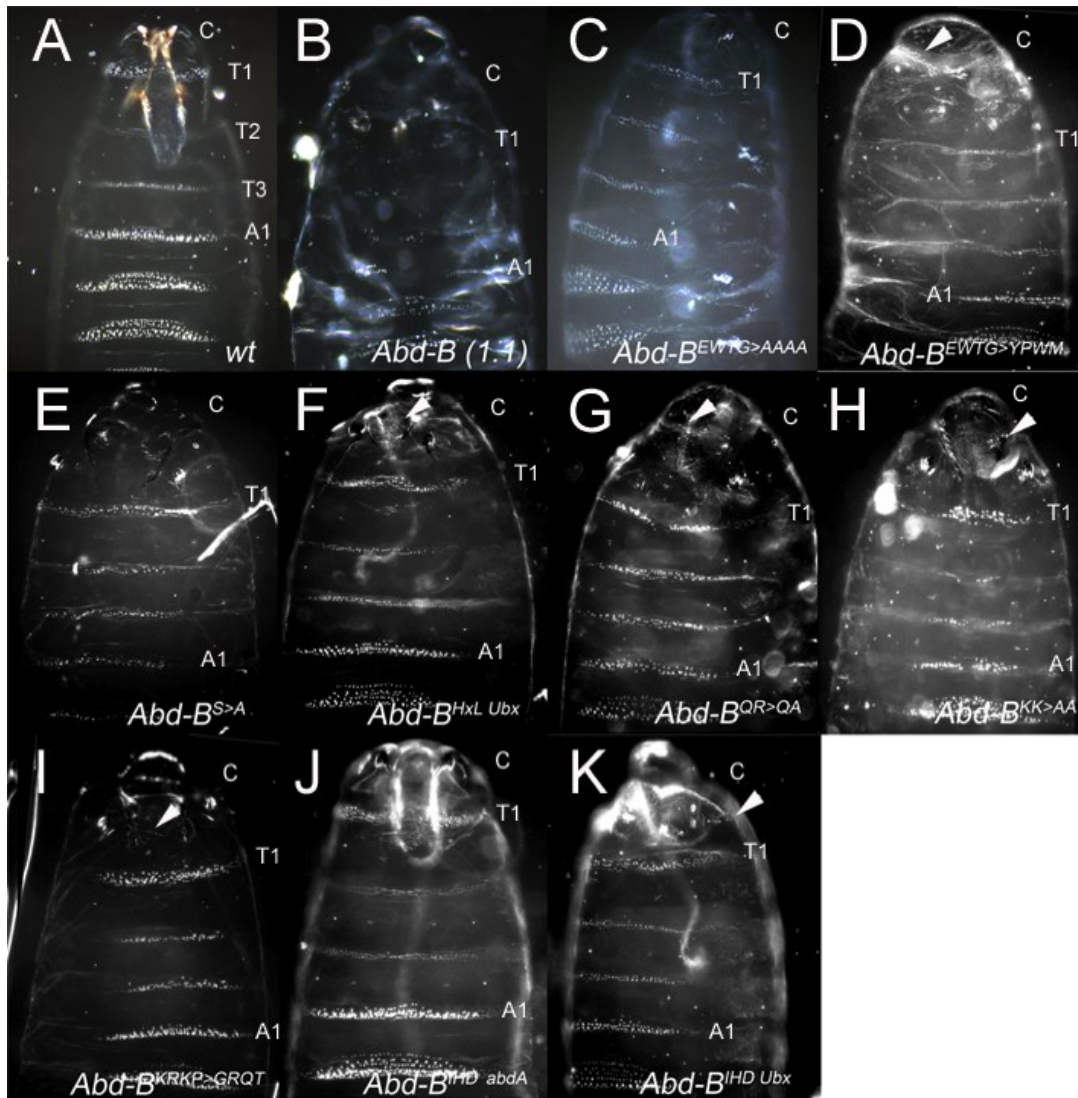


Figura 7. Detalle de los fenotipos de expresión ectópica de las variantes de Abd-B con *arm*-Gal4 a 29°C en la región anterior (cabeza y tórax) de la cutícula embrionaria. Las proteínas expresadas se indican en cada panel. Se indican en el genotipo silvestre (wt) la cabeza (C), las bandas de dentículos de los segmentos torácicos (T) y el primero abdominal (A1). En el resto de paneles, C, T1 y A1. Las flechas indican la presencia de dentículos en la cabeza, no siempre visibles en las fotografías de algunos genotipos.

4.1.5.2 Efectos de la expresión ectópica de Abdominal-B en el embrión

La expresión ectópica de Abd-B en todo el embrión produce transformaciones hacia posterior, como la aparición de EP ectópicos y cambios en la morfología de los dentículos ventrales (Lamka et al., 1992; Kuziora, 1993; Castelli-Gair et al., 1994). Hemos realizado un ensayo piloto expresando *UAS-Abd-B* (ZH35) con diferentes activadores a distintas temperaturas, y decidimos utilizar el activador ubicuo *arm*-Gal4 a 29 °C por su eficacia en la inducción de EP. Describiré los fenotipos producidos por la expresión de *UAS-Abd-B* (ZH35), de anterior a posterior, y de dorsal a ventral. En la región cefálica, se producen defectos en la involución de la cabeza moderados, y aparecen algunos dentículos ventrales ectópicos.

En el tórax, en la región dorsal aparecen un par de EP ectópicos por segmento, con todas sus partes (“filzkörper”, estigmatóforo, y pelos espiraculares). En la región ventral, se reprimen los órganos de Keilin, los dentículos ventrales se reducen en número, y adquieren la morfología triangular característica del abdomen, y la “barba” del T1 se reduce o desaparece. El fenotipo presenta cierta variabilidad, y en los casos en los que es más fuerte, los dentículos ventrales desaparecen. En la región abdominal, dorsalmente, aparecen EP ectópicos, y ventralmente, puntos negros ectópicos. El número de dentículos ventrales se reduce ligeramente (Fig. 6C). Estos efectos son similares a los descritos previamente (Lamka et al., 1992; Kuziora, 1993; Castelli-Gair et al., 1994). La expresión ectópica con *UAS-Abd-B* (1.1) (Fig. 6B, 7B) produce un fenotipo de mayor expresividad, incluyendo la aparición de más espiráculos ectópicos, y que es más aparente en la represión casi completa de los dentículos ventrales en todo el embrión. En el estudio de los fenotipos producidos al expresar ectópicamente las distintas proteínas Abd-B nos hemos concentrado en el análisis de la formación de los EP, ya que se trata de un carácter en el que el control de su desarrollo por Abd-B está bien establecido (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985; Lamka et al., 1992; Kuziora, 1993; Castelli-Gair et al., 2009).

4.1.5.3 Efecto de la expresión ectópica de las mutaciones e intercambios de Abd-B en el desarrollo del embrión

4.1.5.3.1 Región similar al hexapéptido

La expresión ectópica de las variantes de Abd-B con mutaciones sencillas en la región homóloga al hexapéptido (*UAS-Abd-B^{W>A}*, *UAS-Abd-B^{TG>AA}*, *UAS-Abd-B^{EWGTG>AAAA}*) produce los mismos efectos que la expresión de *UAS-Abd-B* (ZH35), es decir, defectos en la invaginación de la cabeza, dentículos ectópicos en la cabeza, represión de los órganos de Keilin, transformación de los dentículos torácicos hacia abdominales, reducción generalizada del número de dentículos, puntos negros ectópicos en el abdomen y aparición de EP ectópicos en los segmentos torácicos y abdominales (Fig. 6D-F; Fig. 7C). La expresión ectópica de *UAS-Abd-B^{EWGTG>YPWM}* no es capaz de inducir la formación de EP ectópicos, pero tiene un efecto similar al de *UAS-Abd-B-M* (ZH35B) sobre el resto de caracteres (Fig. 6G; Fig. 7D). La expresión ectópica de las construcciones *UAS-Abd-B^{N5}* y *UAS-Abd-B^{N6}* no produce efecto alguno (Figs. 6H, I).

4.1.5.3.2 Región del “linker”

La expresión ectópica de la construcción *UAS-Abd-B^{S>A}* produce EP y algunos defectos en la cabeza (Fig. 6J; Fig. 7E). La expresión ectópica de *UAS-Abd-B^{HxL Ubx}* solo actúa sobre ciertos caracteres (Fig. 6K; Fig. 7F): por un lado, no es capaz de inducir la formación de EP ectópicos, produce una transformación reducida de la identidad de los dentículos ventrales torácicos hacia abdominales, y no induce “puntos negros” ectópicos en el abdomen. Por otro lado, sí que es capaz de inducir dentículos ventrales ectópicos en la cabeza y de

reprimir los órganos de Keilin.

4.1.5.3.3 Región del brazo N-terminal

La expresión ectópica de *UAS-Abd-B^{KK>AA}* induce la formación de EP en los segmentos torácicos y abdominales, y una represión de los órganos de Keilin (Fig. 6L; Fig. 7H). Además, se producen defectos en la involución de la cabeza, inducción de dentículos en la cabeza, transformación de dentículos ventrales torácicos hacia abdominales, y la aparición de puntos negros en el abdomen. La expresión de la proteína *Abd-B^{KRKP>GRQT}*, en cambio, produce efectos menores: defectos en la involución de la cabeza, dentículos ectópicos en la cabeza, y transformación de los dentículos torácicos hacia abdominales (Fig. 6M; Fig. 7I), pero no es capaz de inducir EP ectópicos ni de actuar sobre el resto de caracteres.

4.1.5.3.4 Hélice III del homeodominio

Las construcciones *UAS-Abd-B^{Q50>A}*, *UAS-Abd-B^{N51>A}*, *UAS-Abd-B^{I47, Q50, N51>A,A,A}* no producen ningún efecto en la cutícula al expresarlas en todo el embrión (Figs. 6N-P).

4.1.5.3.5 Región C-terminal adyacente al homeodominio

La construcción *UAS-Abd-B^{QR>QA}* también induce EP en el tórax y abdomen. Los órganos de Keilin se encuentran reprimidos en la mayoría de los casos. Respecto al resto de caracteres, los cambios morfológicos son similares a los descritos para la expresión ubicua de la proteína silvestre (Fig. 6Q; Fig. 7G).

4.1.5.3.6 Intercambio de homeodominio con los de Ubx y Abd-A

La expresión ectópica de *UAS-Abd-B^{IHD Ubx}* o *UAS-Abd-B^{IHD Abd-A}* solo produce un cambio parcial de la identidad de los dentículos ventrales torácicos hacia abdominales, una inducción ectópica de “puntos negros” abdominales, y defectos en la involución de la cabeza (Figs. 6R, S; Figs. 7J, K).

Controles Silvestre o Pro. Abd-B	Proteína Abd-B	Presencia de β -gal en Q-vg ^{lacZ} (%)	Quetas en el A7 (fondo mutante)	Dientes vaginales (fondo mutante)	Inducción de EP
Silvestre o Fondo mut.		Sin Abd-B: 100%	F.m. 63±2 (n=5)	wt: 28±2 (n=5)	wt: No
-	Abd-B (1.1)	1%±1	0 (n=10)	6±1, n=9	Si
-	Abd-B (ZH35)	6%±3	21±13 (n=5)	0 (n=10)	Si
Abd-B (ZH35)	Abd-B ^{W>A}	3%±2	0 (n=10)	10 ± 4 (n=9)	Si
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{TG>AA}	13%±4	0 (n=10)	11 ± 5 (n=7)	Si
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{EWGTG>AAAA}	4%±5	0 (n=10)	0 (n=10)	Si
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{EWGTG>YPWM}	4%±2	0 (n=10)	5±4 (n=5)	No
Abd-B (ZH35)	Abd-B ^{N5}	74%±9	41±3 (n=5)	0 (n=10)	No
Abd-B (ZH35)	Abd-B ^{N6}	96%±15	60±7 (n=5)	0 (n=10)	No
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{S>A}	4%±3	0 (n=10)	0 (n=10)	Si
Abd-B (ZH35)	Abd-B ^{HxL Ubx}	25%±9	32±7 (n=5)	10±5 (n=4)	No
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{KK>AA}	1%±2	17 (n=3)	5±2 (n=11)	Si
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{KRRP>GRQT}	8%±4	16 (n=1)	0 (n=10)	No
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{Q50>A}	6%±7	23±6 (n=10)	0 (n=10)	No
Abd-B (ZH35)	Abd-B ^{N51>A}	91±10	60±7 (n=10)	0 (n=10)	No
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{I47, Q50, N51>A, A, A}	2%±2	56±7 (n=10)	0 (n=10)	No
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{QR>QAA}	1%±1	0 (n=10)	9 ± 3 (n=10)	Si
Abd-B (1.1)	Abd-B ^{HDS Ubx}	11±8	40±4 (n=5)	4±5 (n=5)	No
Abd-B (ZH35)	Abd-B ^{HDS Abd-A}	8±6	15±5 (n=5)	0 (n=10)	No

Tabla 2. Cuantificación de resultados del efecto de las variantes de Abd-B sobre los caracteres estudiados. En la primera columna se indica el control de líneas 1.1 o ZH35 con niveles de expresión semejantes a la variante de Abd-B en cada caso, y en la primera fila se muestran los valores silvestres y mutantes.

PARTE II. PAPEL DE HTH Y EXD EN LA MORFOGÉNESIS DEL ABDOMEN POSTERIOR Y LA GENITALIA DE LA HEMBRA, Y SU RELACIÓN CON ABD-B

4.II.1 Introducción

Algunas de las mutaciones en la proteína Abd-B descritas en el apartado anterior podrían afectar a la unión de Abd-B con Exd. Para profundizar en la posible interacción entre estas proteínas y Hth estudiamos el papel de las mismas, y en relación con Abd-B, principalmente en el desarrollo del segmento A7 y en menor extensión, en el de la genitalia de la hembra.

4.II.2 Patrón de expresión de *exd* y *hth* en el abdomen pupal

Hemos analizado el patrón de expresión de *hth*, *exd*, *Abd-B* y *dsx* en el abdomen de la pupa a las 20-22 horas (Ver Materiales y Métodos para una descripción de las dataciones) después de la formación del pupario (DFP). En las imágenes mostramos los nidos de histoblastos dorsales de los segmentos A6 y A7, que dan lugar a los terguitos de estos dos segmentos (en adelante, T6 y T7), para permitir observar las células con mayor detalle.

4.II.2.1 Diferencias en la expresión de *hth* entre el T6 y el T7 de machos

En ese momento del desarrollo, Hth y Exd se expresan tanto en los histoblastos como en las células larvarias de todos los segmentos, pero en los machos su expresión es mayor en el T7 que en el T6 (Fig. 8A), aunque las diferencias no son tan notables como las que tiene Abd-B entre estos dos segmentos (Fig. 8A). La expresión de Abd-B y la de Hth en el T7 no es uniforme. En el nido de histoblastos del T7, las células que expresan mayores niveles de Abd-B no coinciden exactamente con las que expresan mayores niveles de Hth (Fig. 8A). La expresión de Dsx también es mayor en el A7 que en el A6 (Wang y Yoder, 2012; Foronda et al., 2012), y en este caso en machos observamos una colocalización precisa con las células que expresan mayores niveles de Hth (Fig. 8B, E). Exd se expresa de un modo similar al de Hth (Fig. 8F).

4.II.2.2 Diferencias en la expresión de *hth* entre las hembras y los machos

El abdomen posterior es dimórfico, y en su especificación interviene la expresión diferencial de varios factores de transcripción en función del sexo. Por ejemplo, la expresión de Dsx en el A7 es 2.5 veces mayor en machos (DsxM) que en hembras (DsxF) (Wang y Yoder, 2012), mientras que la de Abd-B se ha descrito como similar (Kopp et al., 2000; Wang y Yoder, 2012). Para detectar diferencias de expresión en función del sexo, hemos realizado el protocolo inmunohistoquímico y la adquisición de imágenes en idénticas condiciones en ambos sexos (ver Materiales y Métodos). Hemos observado que Abd-B se expresa con el mismo patrón en machos y hembras (con mayor intensidad en el A7 que en el A6), pero con unos niveles mayores en machos, siendo en el T7 2.5 veces mayores que

en las hembras (n=16, comparar 8A con 8C, gráfico 8G). De forma concordante con lo publicado (Wang y Yoder, 2012), la expresión de *Dsx* también es mayor en los machos que en las hembras, en las que en muchos casos está en el límite de la detección (comparar 8B con 8D). En el caso de *Hth*, su expresión en el T7 de hembras es similar o disminuye ligeramente respecto al T6, mientras que en el T7 de machos aumenta respecto al mismo segmento. La expresión de *Hth* en el T7 es 1.7 veces mayor en machos que en hembras (n=16, comparar 8A con 8C, o 8B con 8D, gráfico 8G).

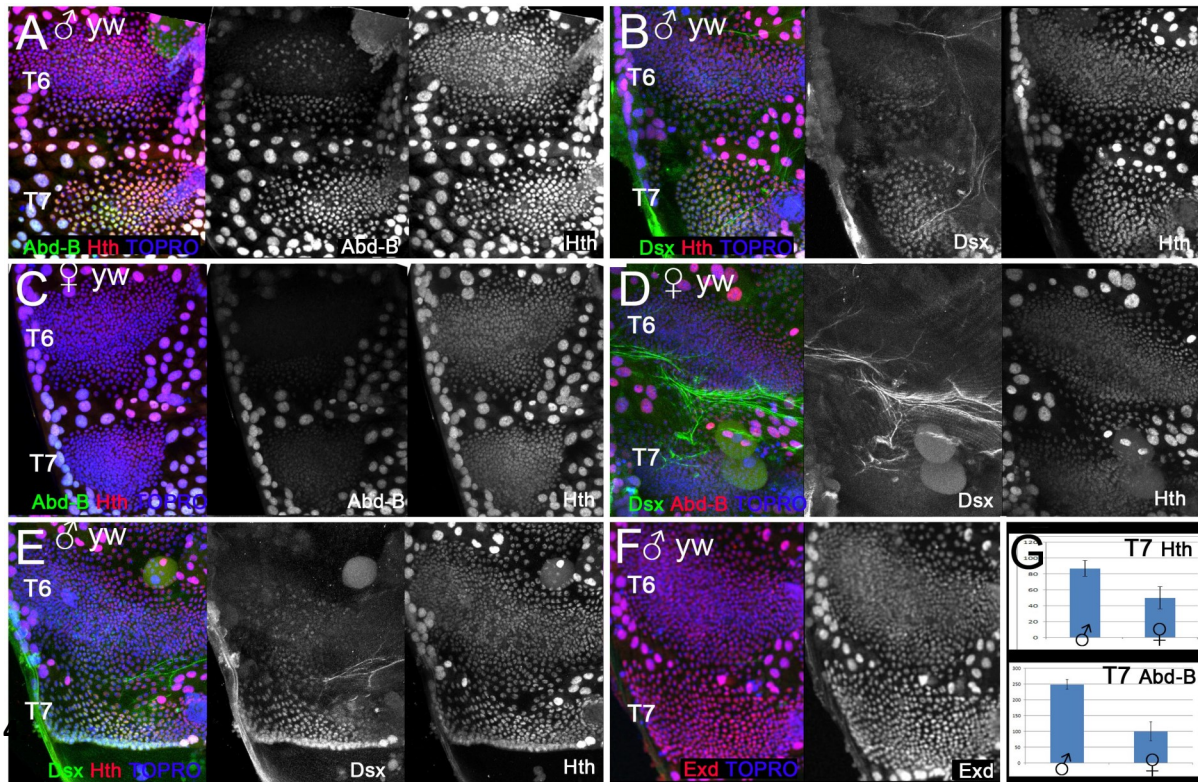


Figura 8. Tinciones de los nidos de histoblastos dorsales correspondientes a los segmentos A6 y A7 de machos (A, B, E, F) y hembras (C, D) y w, con los siguientes anticuerpos: A) Abd-B y Hth; B) Dsx y Hth; C) Abd-B y Hth; D) Dsx y Hth; E) Dsx y Hth; F) Exd. En todas los paneles se muestra, además la tinción con To-Pro. G) Representación gráfica de los niveles de expresión de Abd-B (gráfico superior) y Hth (gráfico inferior) en machos (barra de la izquierda) y hembras (barra de la derecha).

II.3 Requerimiento mutuo de *Exd* y *Hth*

Hemos comprobado, con las mismas herramientas que hemos utilizado para el resto de experimentos, que las relaciones conocidas entre *Exd* y *Hth* (Aspland y White, 1997; Pai et al., 1998; Abu-Shaar et al., 1999) se cumplen en la región que estamos estudiando. El silenciamiento (nos referimos por silenciamiento a la actividad de disminuir la expresión de un gen usando una línea RNAi) de *exd* en pupas del genotipo *UAS-exd RNAi/+; pnr-Gal4 UAS-GFP/+* produce una disminución de la expresión de *Exd*, y una bajada de los niveles de *Hth* (Fig. 9A). Asimismo, el silenciamiento de *hth* en pupas del genotipo *UAS-hth RNAi/+; pnr-Gal4 UAS-GFP/+* es igualmente efectivo, pero no produce una translocación de *Exd* del núcleo al citoplasma, sino una disminución de los niveles de expresión de *exd* (Fig. 9B), lo cual no se había descrito previamente.

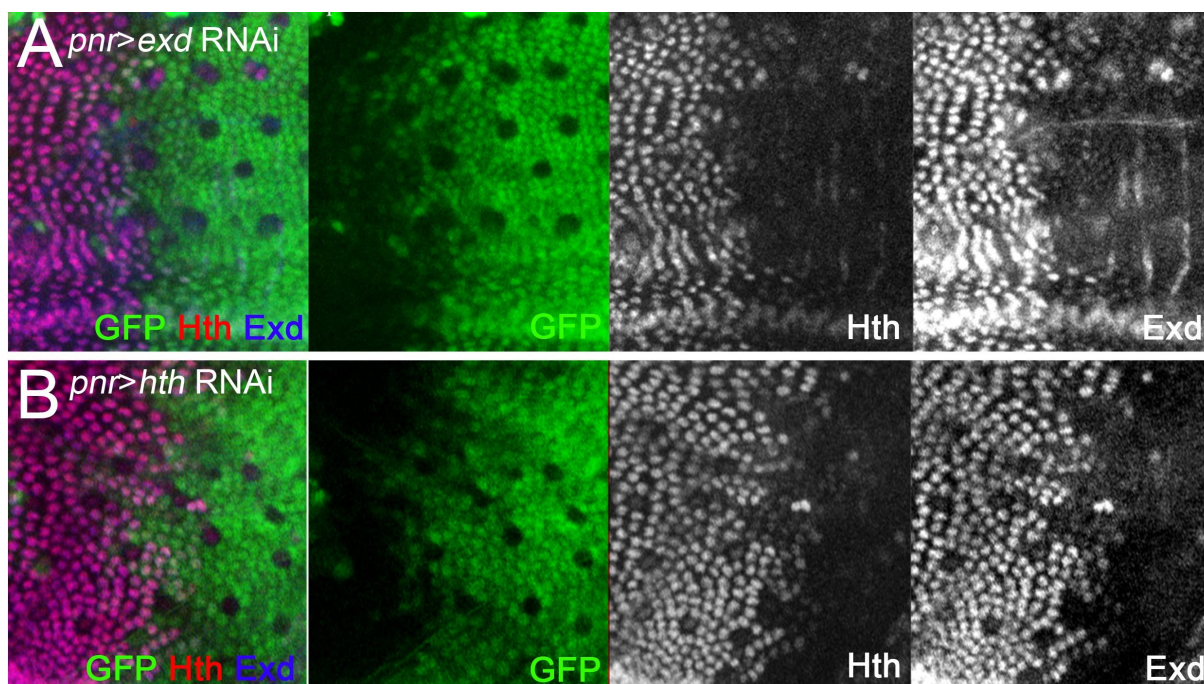


Figura 9. Imágenes de parte de un segmento dorsal de genotipo *UAS-exd RNAi/+; pnr-Gal4 UAS-GFP/+* (A), o *UAS-hth RNAi/+; pnr-Gal4 UAS-GFP/+* (B) teñidos con anti-Hth, anti-Exd y GFP. La pérdida de una proteína implica la pérdida de la otra

4.II.4 Requerimiento de *exd* y *hth* para la morfogénesis del A7

Como hemos descrito en la Introducción, Exd es un cofactor de las proteínas Hox, que se requiere tanto en etapas embrionarias (Peifer y Wieschaus, 1990), como en etapas adultas (Rauskolb et al., 1995, González-Crespo y Morata, 1995). La pérdida de *exd* en el abdomen del embrión produce transformaciones de A1-A4 hacia A5, mientras que en los segmentos más posteriores no hay cambios. Además aparece un fenotipo segmental debido a la pérdida de expresión de En (Wieschaus et al., 1984; Peifer y Wieschaus, 1990). En el abdomen adulto, los clones de pérdida de *exd* sufren las siguientes transformaciones: del A1 al A4 se producen transformaciones hacia A5-A6 (Rauskolb et al., 1995; González-Crespo y Morata, 1995). En cuanto a los segmentos posteriores, se ha descrito que el A6 se transforma en A5, y el A7 en A6 (Rauskolb et al., 1995), o que no cambian de identidad (González-Crespo y Morata, 1995). Además, se han descrito clones de *hth* en la región anterior del abdomen, que transforman hacia una identidad posterior (Ryoo et al., 1999), pero no se hace referencia a otro tipo de transformación. Con estas bases, decidimos profundizar en el estudio del requerimiento de *exd* y *hth* en el abdomen adulto.

En nuestros experimentos, en los machos *761-Gal4/UAS-exd RNAi* (Fig. 10D) o *761-Gal4/UAS-hth RNAi* a 25°C (Fig. 10E), aparece un A7 de tamaño reducido, sin tricomas,

similar al que aparece en la heterocigosis para un alelo nulo de *Abd-B* (*Abd-B^{M1}/+*). En las hembras *761-Gal4/UAS-exd RNAi* (Fig. 10N) o *761-Gal4/UAS-hth RNAi* (Fig. 10O), el tamaño del A7 se reduce respecto al que hay en el silvestre. Cuando realizamos los experimentos a 29°C, el A7 que aparece en los machos o hembras es menor. El silenciamiento de *hth* o *exd* con *pnr-Gal4* a 25°C o a 29°C produce la aparición de tricomas en la zona central del T6 de ambos sexos, donde normalmente no hay (Fig. 11C, D). Sin embargo, el A7 de los machos se mantiene reprimido, y el de las hembras, se reduce de tamaño. Todos los terguitos se pigmentan, incluso en las hembras, y su tamaño se reduce en la región dorsal, mientras que la membrana intersegmental aumenta (comparar Fig. 11G con 11F). Finalmente, clones *hth^{P2}* inducidos en la cutícula adulta no muestran ningún cambio de patrón en los terguitos T6 o T7, excepto algunos casos de clones en la zona lateral o superior que producen la formación de unos pocos tricomas, sugiriendo, como en el caso anterior, una transformación hacia A5 (Fig. 11E, F).

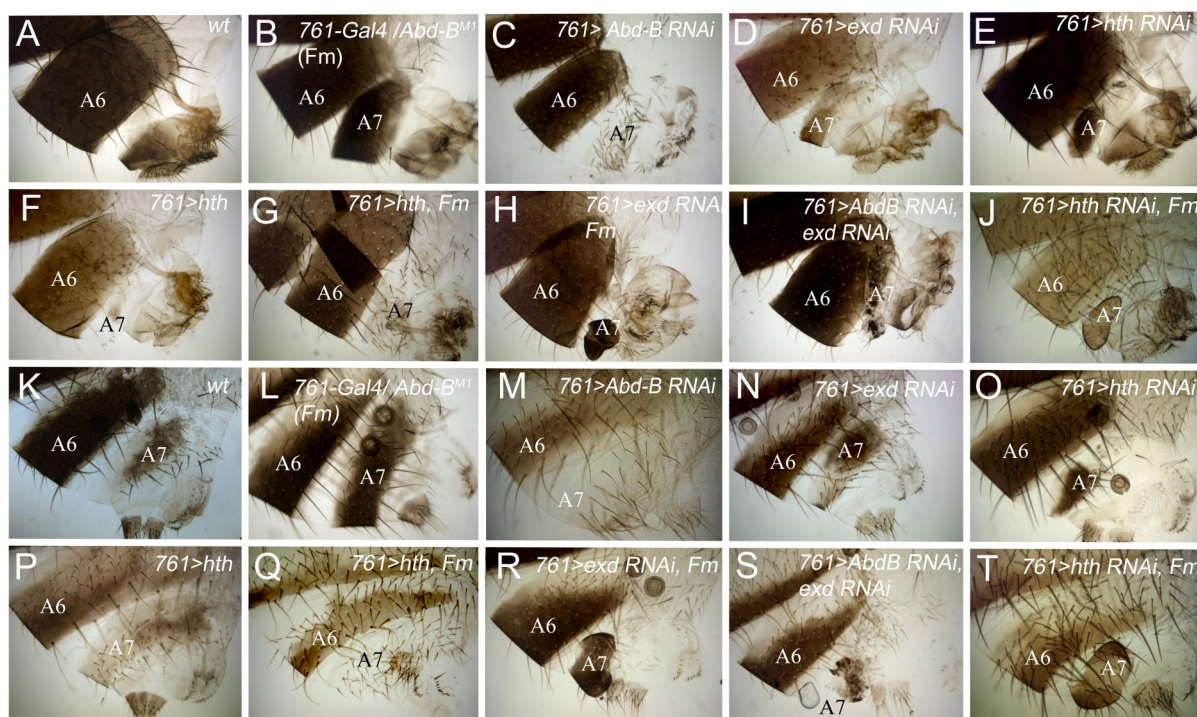


Figura 10. Requerimiento de *hth* y *exd* en el A7 de machos (A-J) y de hembras (K-T). A) Macho wt (silvestre). B) *UAS-y+ 761-Gal4/Abd-B^{M1}*. C) *761-Gal4 UAS-GFP/UAS Abd-B RNAi*. D) *UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/+*. E) *UAS-hth RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/+*. F) *UAS-hth/+; 761-Gal4 UAS GFP/Abd-B^{M1}*. G) *UAS-hth/+; 761-Gal4 UAS GFP/Abd-B^{M1}*. H) *UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4/Abd-B^{M1}*. I) *UAS-Abd-B RNAi/ UAS-exd RNAi; 761-Gal4/+*. J) *UAS-hth RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*. K) Hembra silvestre (wt). L) *761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*. M) *761-Gal4 UAS-GFP/ UAS Abd-B RNAi*. N) *UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/+*. O) *UAS-hth RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/+*. P) *UAS-hth/+; 761-Gal4 UAS-GFP/+*. Q) *UAS-hth/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*. R) *UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*. S) *UAS-Abd-B RNAi/+; UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4/+*. T) *UAS-hth RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*.

La sobreexpresión de *Hth* con *761-Gal4* a 29°C, produce en machos un A7 (Fig. 10F), de un tamaño mucho menor que el que aparecía con el silenciamiento. Sin embargo, en las hembras, el A7 aumenta fuertemente de tamaño (Fig. 10P), adquiriendo la identidad del A6. La sobreexpresión de *hth* con *pnr-Gal4* en los machos produce la transformación de los segmentos A5 y A6 hacia A4, mientras que el A7 se mantiene reprimido (Fig. 11A). En las hembras, el A5, A6, y A7 se transforman hacia A4, como se evidencia por la pérdida de pigmentación y aparición de tricomas (Fig. 11B).

Hemos estudiado el papel de *Exd-Hth* en el A7 en un fondo mutante de *Abd-B* (*761-Gal4/ Abd-B^{M1}*), que cambia la identidad del A7 en A6 (Figs. 10B y 10L, comparar con el silvestre en Fig. 10A y 10K), y en un fondo mutante obtenido por eliminación de *Abd-B* (*761-Gal4, UAS-GFP/ UAS-Abd-B RNAi*), que transforma el A7 en A4 (Figs. 10C y 10M). La reducción de la expresión de *exd* o el de *hth* en el primer fondo mutante (*UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/ Abd-B^{M1}*; o *UAS-hth RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*) produce una fuerte reducción del tamaño del A7 tanto en machos como en hembras (Figs. 10H, J, R y T). El silenciamiento de *exd* en el segundo fondo mutante (*UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-Abd-B RNAi*), produce fenotipos similares a los anteriores, pero de mayor intensidad: el A7 desaparece, tanto en los machos como en las hembras, persistiendo restos necrosados (Figs. 10I y 10S). En cuanto a los experimentos de sobreexpresión, en adultos del genotipo *UAS-hth; 761-Gal4, UAS-GFP/Abd-B^{M1}* (Figs. 10G y 10Q) se produce una transformación hacia A4, evidenciada por la aparición de tricomas y la pérdida de pigmentación. Estos resultados indican que la pérdida de la expresión de *hth* o *exd* produce un pequeño segmento A7 en machos (sugiriendo una transformación hacia un segmento anterior) y una reducción del tamaño del A7 en hembras, y que esta reducción no depende de *Abd-B*. También sugieren que la sobre-expresión de *hth* en el A7 inactiva *Abd-B* en hembras, pero apenas lo hace en machos.

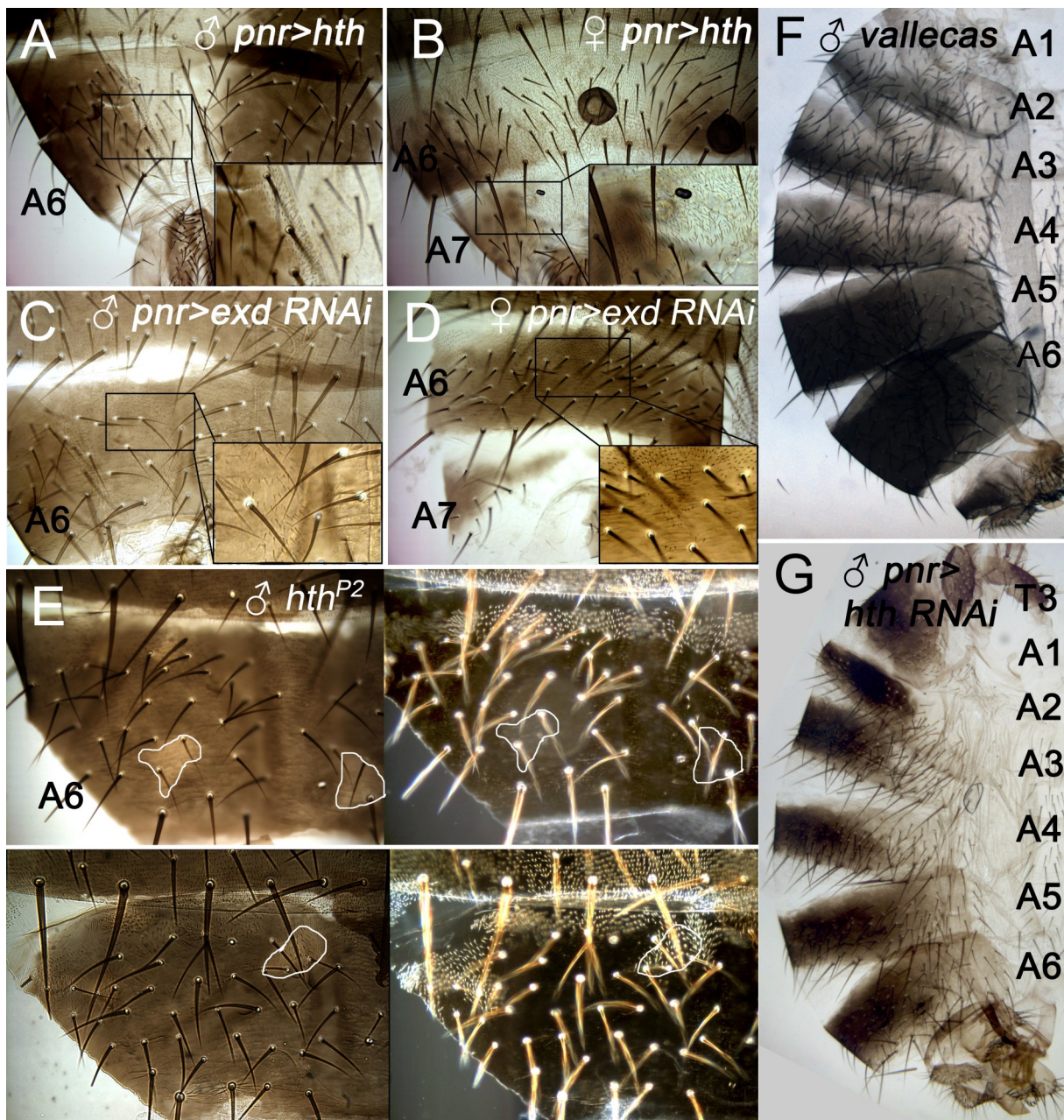


Figura 11. Requerimiento de *hth* y *exd* en el abdomen posterior. A) macho *UAS-hth/+*, *pnr-Gal4 UAS-GFP/+*. B) Hembra del mismo genotipo. C) macho *pnr-Gal4/UAS-exd RNAi*, D) hembra del mismo genotipo. E) y F) clones *hth*^{P2} que se pueden distinguir por la pérdida del marcador y. Los clones en E no afectan a la cutícula, y los de F inducen tricomas (ver imágenes de la derecha). G) Macho silvestre. F) Macho *pnr-Gal4/UAS-exd RNAi*.

4.II.5 Regulación de *exd* y *hth* en el abdomen posterior

4.II.5.1 Introducción

La relación entre *exd*, *hth* y los genes Hox en el embrión es bien conocida. Mientras que *Exd* no regula transcripcionalmente a los genes Hox (Peifer et al., 1990), los genes Hox del C-BX, particularmente *Abd-B*, regulan negativamente tanto la expresión de *exd* y *hth* (Rauskolb et al., 1993; Kurant et al., 1998; Sambrani et al., 2013; Rivas et al., 2013), como la

translocación de Exd al núcleo (Azpiazu y Morata, 1998), necesaria para su activación (Mann y Abu-Shaar, 1997; Aspland y White, 1997). En el dominio embrionario *Abd-B*, por tanto, *hth* se expresa débilmente y la proteína Exd se encuentra en el citoplasma (Rauskolb et al, 1993; Azpiazu y Morata, 1998). Hemos estudiado la regulación entre *exd*, *hth* y *Abd-B* en la pupa ya que en este momento del desarrollo hay co-expresión de las proteínas Abd-B, Hth y Exd (Fig.8).

4.II.5. 2 Regulación de la expresión de *hth* por *Abd-B*

En pupas machos de 22 h. DFP, la expresión de Hth se encuentra elevada en el T7 respecto al T6 (Fig. 12A). Al silenciar *Abd-B* en la combinación *761-Gal4 UAS-GFP/UAS-Abd-B RNAi* se observa, en machos de 22 h. DFP que los niveles de Hth en el T7 no varían o aumentan ligeramente respecto al T6 (Fig. 12B). A las 26 h. aumentan fuertemente (Fig. 12C), un momento en el que el A7 silvestre ya se ha perdido (no mostrado). En clones de pérdida de *Abd-B* inducidos en machos en el periodo larvario (*hs-flp122; FRT82B ubi-GFP/FRT82B Abd-B^{M1}*) se puede observar en el T7, a las 22-24 h. DFP, que la expresión de Hth se hace más heterogénea, y en general aumenta en los clones gemelos (de genotipo silvestre), mientras que en los clones mutantes (*Abd-B^{M1}/Abd-B^{M1}*) en algunos casos no cambia (Fig. 12G), si bien no hay una correspondencia perfecta entre genotipo silvestre y altos niveles de Hth en todos los casos. En pupas hembras de 22-24 h. DFP la expresión de Hth es semejante en el A6 y el A7 (Fig. 12D). Al silenciar *Abd-B* en la combinación *761-Gal4 UAS-GFP/UAS-Abd-B RNAi* se observa, en hembras de 22 h. DFP que los niveles de Hth en el T7 se incrementan respecto al T6 (Fig. 12E). A las 26 h. aumentan fuertemente (Fig. 12F) En el caso de los clones en hembras de 22 h. HDP, se produce el efecto opuesto que en los machos, aumentando la expresión de Hth en el clon, y reduciéndose en el clon gemelo (Fig. 12H), si bien nuevamente en ese estadio hay variabilidad. Cuando se observan los clones en hembras de 26 h. DFP, el incremento de Hth es muy claro (Fig. 12G). Se ha observado un efecto semejante en los dos sexos utilizando el alelo *Abd-B^{D16}*. Ya que el fondo heterocigótico para *Abd-B* podría alterar la expresión de Hth y dificultar así la determinación de los niveles de Hth en los clones mutantes, decidimos realizar clones de sobreexpresión de *Abd-B RNAi*. En pupas macho del genotipo *hs-flp122/+; act>y⁺>Gal4 UAS-GFP/ UAS Abd-B RNAi* a las 20 h. DFP, se observa en algunos clones una ligera disminución de los niveles de expresión de Hth (Fig. 12H).

En los experimentos de sobreexpresión de *Abd-B* el efecto es diferente dependiendo del sexo. En hembras del genotipo *UAS-Abd-B/+; pnr-Gal4 UAS-GFP/tub-Gal80^{ts}* los niveles de Hth disminuyen en la región de expresión del activador, mientras que en los machos aumentan en el mismo dominio (Figs. 12K y 12L). Cuando sobre expresamos *Abd-B* a niveles menores (Figs. 12M y 12N), en las hembras la expresión de *hth* disminuye, mientras que en los machos no cambia.

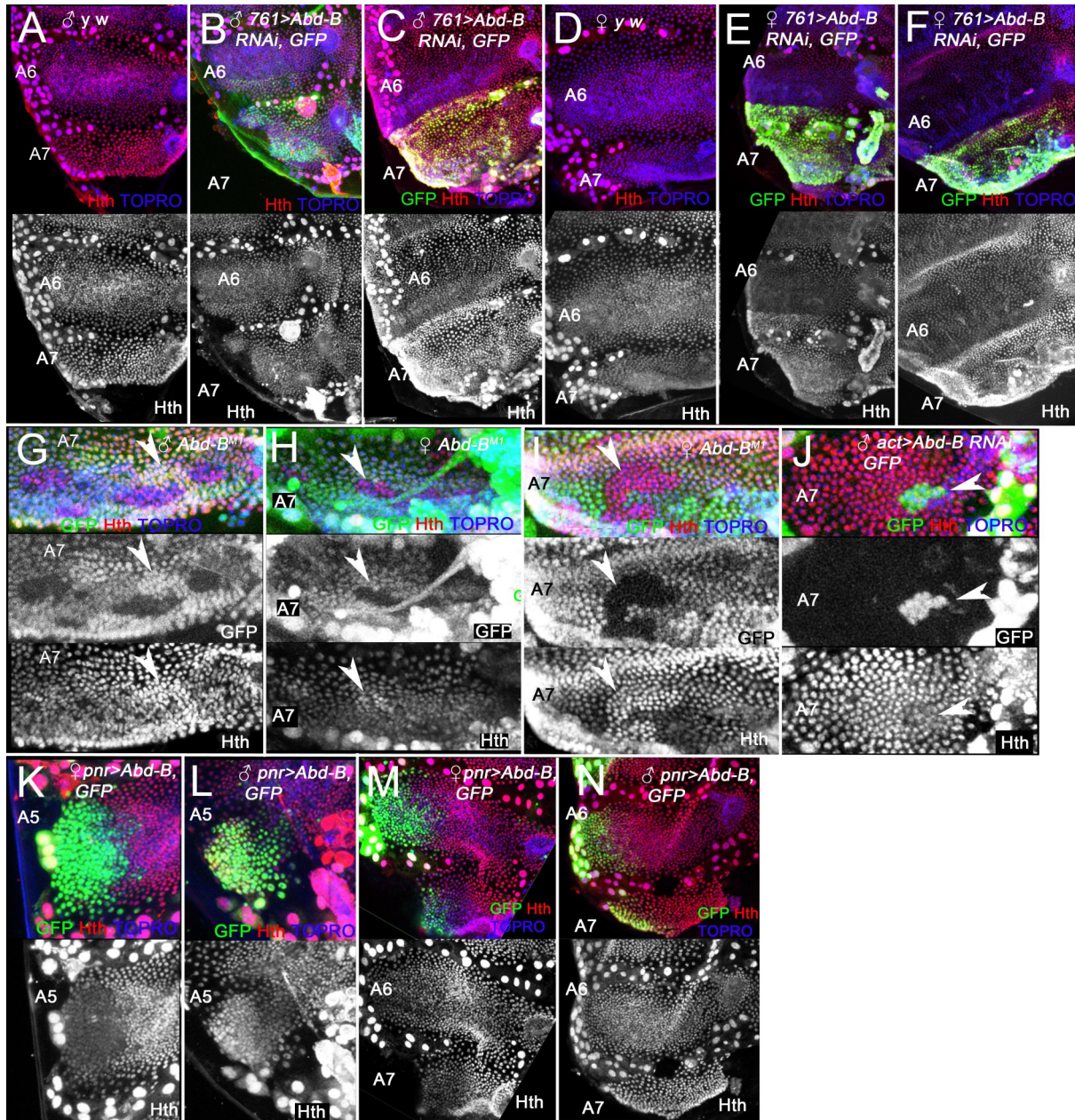


Fig. 12. Regulación de *hth* por *Abd-B*. Todas las imágenes muestran tinciones contra Hth. A) Macho y w. B) Macho 761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-*Abd-B* RNAi (22 h. DFP). C) Macho del mismo genotipo (26 h. DFP). D) Hembra y w. E) Hembra 761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-*Abd-B* RNAi (22 h. DFP). F) Hembra del mismo genotipo (26 h. DFP). G) Macho con clones *Abd-B*^{M1} (22 h. DFP). H) Hembra con clones *Abd-B*^{M1} (22 h. DFP). I) Hembra de 26 h. DFP con clones *Abd-B*^{M1}. J) Macho de 20 h. DFP con clones UAS-*Abd-B* RNAi. K) Hembra UAS-*Abd-B*/ *tub-Gal80*^{ts}, *pnr-Gal4* UAS-GFP/ +. L) Macho del mismo genotipo. M) Hembra UAS-*Abd-B* (ZH35)/*tub-Gal80*^{ts}, *pnr-Gal4* UAS-GFP/ UAS-GFP (22 h. DFP). N) Macho del mismo genotipo (22 h. DFP).

4.II.5.3 Regulación de la expresión de *Abd-B* por *hth*

En la imagen 13A se muestra una tinción inmunohistoquímica que refleja la expresión de *Abd-B* en una pupa macho del genotipo *761-Gal4 UAS-GFP/+*. Se puede apreciar que los niveles de *Abd-B* son mayores en el A7 que en el A6, y éstos, a su vez, mayores que los del A5 (Kopp et al, 2000; Kopp y Duncan, 2002; Foronda et al., 2012; Wang y Yoder, 2012). El silenciamiento de *hth* en el segmento A7 (*761-UAS GFP/UAS-hth RNAi*) produce un descenso de los niveles de *Abd-B*, salvo en sus regiones más posteriores (Fig. 13B) También hemos realizado un análisis clonal del efecto de la pérdida de *hth*, bien induciendo clones que expresan *hth RNAi* (Fig. 13F) o bien en clones mutantes para *hth*^{P2} (13G-I). En ambos tipos de clones se observa una disminución de los niveles de *Abd-B*, pero el efecto es más marcado en las etapas más tardías de la pupación, como en la figura 13H, que tienen 26 h. DFP, mientras que las figuras 13F y 13G son de 22-24 h. DFP. La expresión de *Abd-A* en los clones *hth*^{P2} sufre una reducción similar (FIG. 13I).

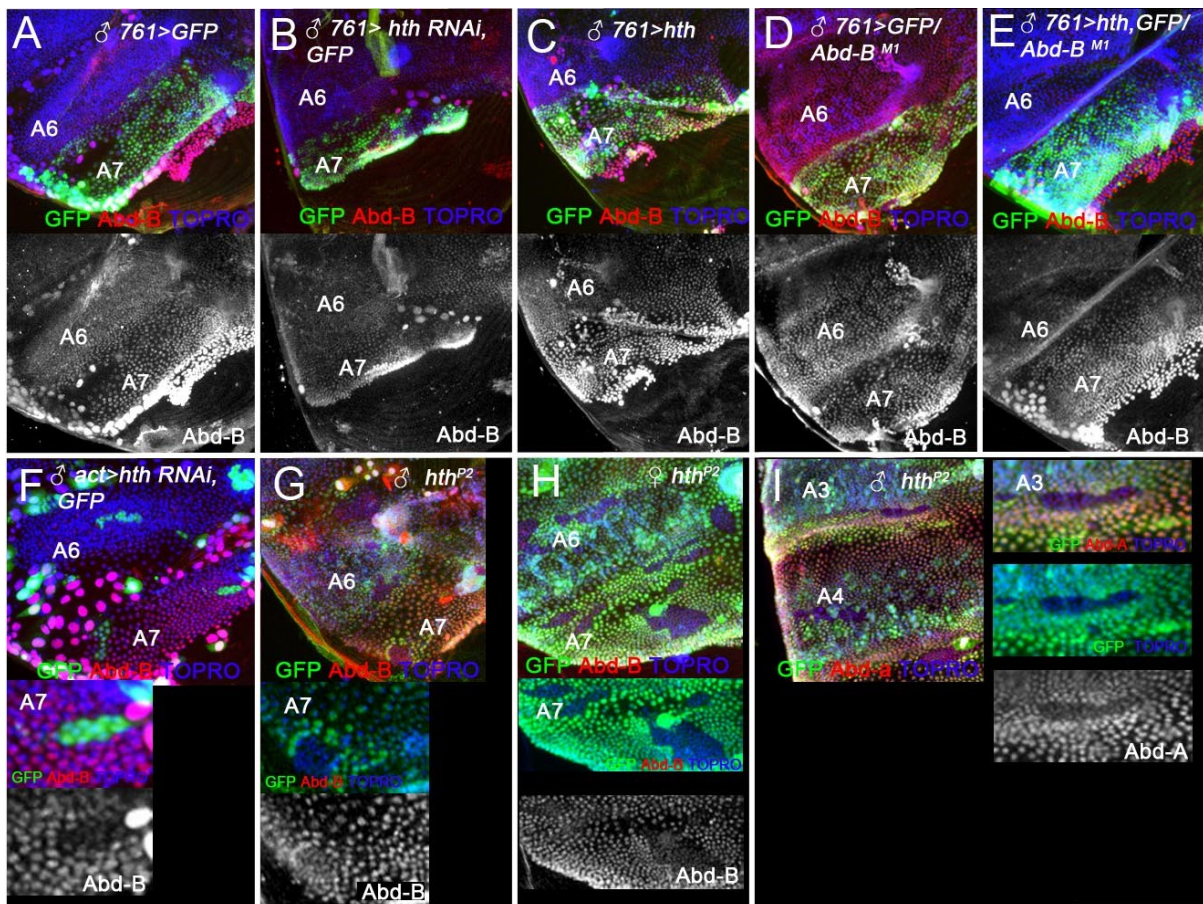


Fig. 13. Efecto de *hth* en la expresión de *Abd-B* y *abd-a*. Se muestran tinciones contra *Abd-B* salvo en I) que es contra *Abd-A*. A) macho *761-Gal4 UAS-GFP/+*. B) Macho *761-Gal4 UAS-GFP/ UAS hth RNAi*. C) machos *UAS-hth/+*, *761-Gal4 UAS-GFP/+*. D) Macho *761-Gal4 UAS-GFP/ Abd-BM1*. E) macho *UAS-hth/+*, *761-Gal4 UAS GFP/Abd-BM1* F) Macho con clones de *hth RNAi*. G) Macho con clones *hth*^{P2}. H) Hembra con clones *hth*^{P2}. I) Macho con clones *hth*^{P2}

Consistentemente con los fenotipos de pérdida de función, la sobreexpresión de *hth* en el segmento A7 (*761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-hth*) produce un incremento de los niveles de Abd-B en el T7 respecto al T6, mayor que el que se observa en las pupas control (Fig. 13C, comparar con 13A). Para comprobar este resultado, hemos estudiado el efecto de la sobreexpresión de *hth* en una combinación mutante de *Abd-B* (*761-Gal4 UAS-GFP/ Abd-B^{M1}*) en la que los niveles de Abd-B son similares en el A7 y en el A6, y por tanto se produce una transformación de A7 hacia A6 (Fig. 13D). Si en ese mismo fondo mutante se sobreexpresa *hth* (*UAS-hth/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*) los niveles de Abd-B en el A7 se incrementan hasta ser similares a los que había en el silvestre (comparar 13A con 13D y 13E). Sin embargo, los adultos de ambos sexos de este genotipo muestran un A7 cuya identidad es de A4, lo que indica que la proteína Abd-B no se encuentra activa en dichas condiciones.

El que al sobreexpresar *hth* aumenten los niveles de Abd-B pero disminuya su función nos llevó a plantear la posibilidad de la existencia de una autorregulación negativa de la expresión de *Abd-B* en función de su actividad, por lo que decidimos comprobar esto mediante la sobreexpresión de *Abd-B* en un fondo genético con un elemento indicador de la expresión de *Abd-B*, *Abd-B¹⁹⁹LacZ*. En pupas del genotipo *UAS-Abd-B/tub-Gal80^{ts}; pnr-Gal4 UAS GFP/Abd-B¹⁹⁹LacZ* cambiadas de temperatura de 17 °C a 29 °C al inicio de la pupación, se observa una reducción de la expresión de β-galactosidasa en el dominio *pnr* (Fig. 14). La reducción es más notable en el T5 y T6 que en el T7. Por lo tanto, *Abd-B* es capaz de reprimir su propia transcripción.

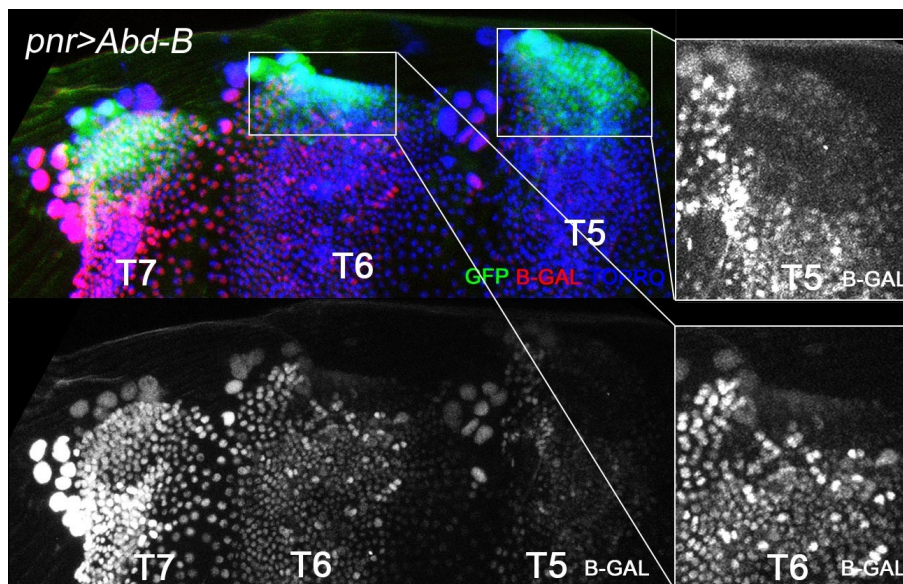


Figura 14. Segmentos posteriores del abdomen de una pupa de genotipo *UAS-Abd-B/tub-Gal80^{ts}; pnr-Gal4 UAS GFP/Abd-B¹⁹⁹LacZ*. La expresión de β-galactosidasa (que refleja la de *Abd-B* endógeno) disminuye en el dominio *pnr*.

Ya que la pérdida y la sobreexpresión de *Abd-B* tienen, en circunstancias determinadas, un efecto dimórfico en el desarrollo del A7 y en la regulación de *hth* en este segmento, decidimos estudiar el efecto de la vía de determinación sexual sobre la expresión

de *hth*. El efector somático de la vía de determinación sexual es la proteína Dsx, que sufre un splicing alternativo generando las proteínas DsxM en los machos y DsxF en las hembras. Los niveles de expresión de *dsx* aumentan en el A7 respecto al A6 debido a los mayores niveles de Abd-B en el segmento posterior (Wang et al., 2012; Foronda et al., 2013).

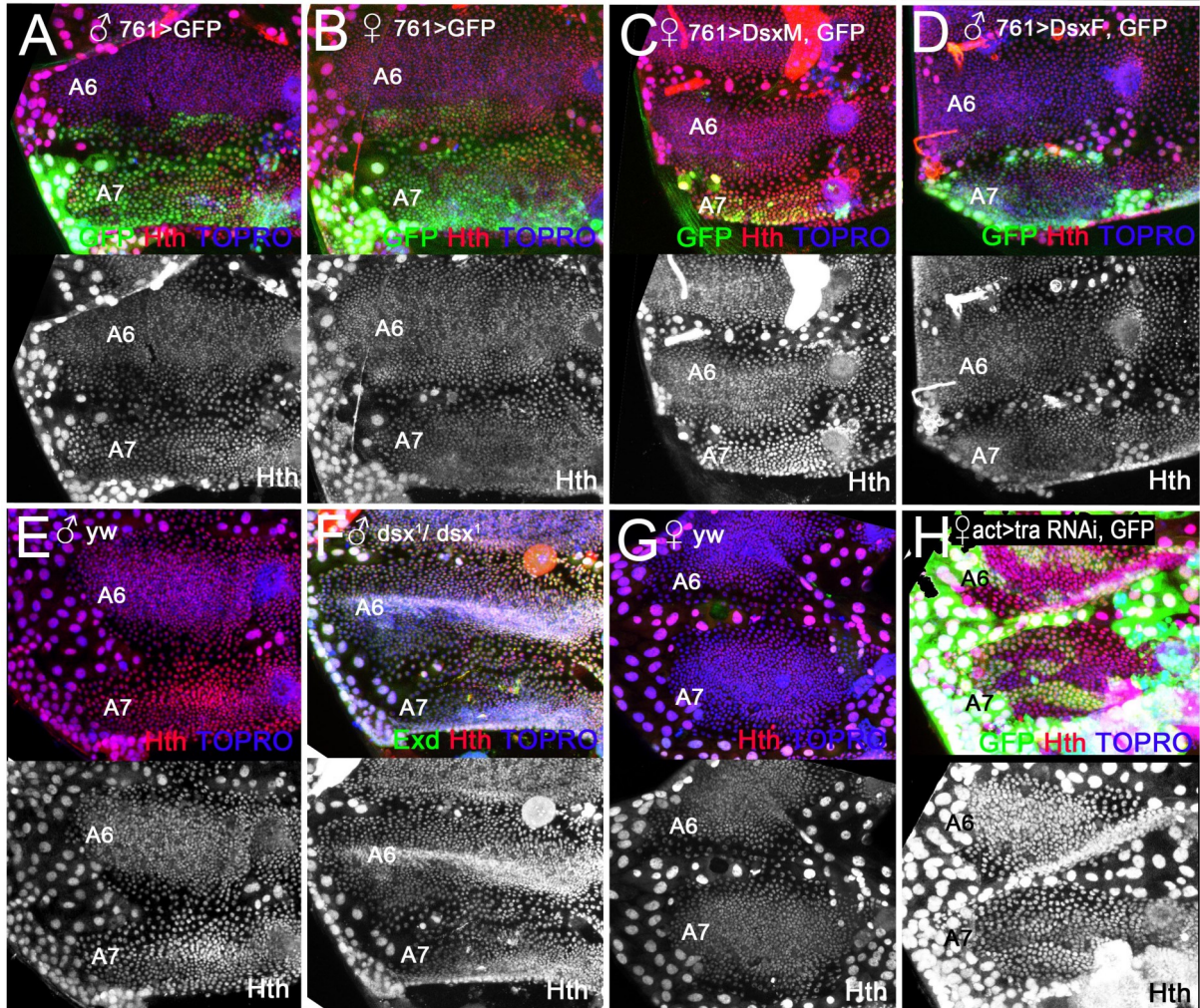


Fig.15. Regulación de *hth* por *dsx*. En todas las imágenes se muestran tinciones contra Hth. A) Macho 761-Gal4 UAS-GFP/+. B) Hembra 761-Gal4 UAS-GFP/+. C) Hembra 761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-DsxM. D) macho 761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-DsxF. E) Macho y w. F). Macho *dsx1/dsx1*. G) Hembra y w. H) Hembra con clones *tra RNAi* (marcados con GFP)

En machos de genotipo 761-Gal4 UAS-GFP/+ se puede apreciar que los niveles de Hth en el T7 son más elevados que en el T6 (Fig. 15A), algo que no ocurre en las hembras (Fig. 15B). Estos resultados son similares a los que hay en los individuos y w (Fig. 15E y G). En hembras de genotipo UAS-DsxM/+; 761-Gal4 UAS-GFP/+, los niveles de Hth en el T7 suben fuertemente respecto al T6 (Fig. 15C). Los adultos de este genotipo sufren una transformación hacia macho, evidenciada en la desaparición del A7 (Foronda et al., 2012). Por contra, en machos UAS-DsxF/+; 761-Gal4 UAS-GFP/+, los niveles de Hth se reducen parcialmente (Fig.15D), hasta ser similares a los de las hembras 761-Gal4 UAS-GFP/+ (Fig.

15B). En machos (XY) mutantes para *dsx* los niveles de *Hth* en el T7 son similares a los del A6 (Fig. 15F), al contrario de lo que ocurre en los individuos silvestres (comparar con Fig. 15E). Hemos realizado también un análisis clonal del efecto del cambio de sexo en la expresión de *hth*. En pupas hembras, la reducción de la expresión de *tra* produce un cambio al sexo masculino debido al procesamiento de *dsx* a la forma *DsxF*. En pupas hembra de 22 h. DFP se puede observar en los clones *tra* (*hs-flp122; act>y+>Gal4, UAS-GFP/ UAS-tra RNAi*), un incremento de la expresión de *hth*, que es más notable en las etapas más tardías (24 h. DFP) y en zonas específicas del T7 (Fig. 15H).

4.II.6 Regulación de dianas controladas por *Abd-B* en el segmento A7

Hemos estudiado la regulación de *exd* y *hth* sobre dos dianas comunes de *Abd-B*: *wingless (wg)* (Wang et al., 2011) y *bric-à-brac (bab1 y bab2)* (Kopp et al., 2000; Couderc et al., 2002), con el objetivo de determinar su influencia en la morfogénesis del A7.

4.II. 6.1 Regulación de *wg*

Tal y como se ha explicado en la Introducción, en los machos el A7 desaparece durante la fase intermedia de la pupación. *Wg*, una glicoproteína secretable cuyos homólogos en mamíferos pertenecen a la familia Wnt, está implicado en la morfogénesis del A7. La expresión de *wg* está reprimida por *Abd-B* y *DsxM*, y, como consecuencia de ello, su expresión se encuentra ausente en el A7 de los machos (Wang et al., 2011).

En el “pouch” del disco imaginal de ala se ha descrito que la expresión ectópica de *Hth* es capaz de reprimir la expresión de *wg* (Azpiazu y Morata, 2000). En ese territorio no se expresa ningún gen *Hox*, por lo que la represión de *wg* por *hth* debe ser independiente de su actividad como cofactor de las proteínas *Hox*. Con estos antecedentes, decidimos comprobar si esta regulación también actuaba en el abdomen. En las figuras 16A y 16B se observa una tinción contra *Wg* en macho y hembra, respectivamente, del genotipo *761-Gal4 UAS-GFP*. Se puede apreciar que en machos la expresión de *wg* está reprimida en A7, mientras que en hembras está presente (Wang et al., 2011). En machos del genotipo *761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-exd RNAi* (Fig. 16C) o del genotipo *761-Gal4 UAS-GFP/UAS-hth RNAi* (Fig. 16D) el tamaño del A7 a las 20-22h. DFP se reduce y expresa *Wg*. Concordantemente, la sobreexpresión de *Hth* en machos de genotipo *761-Gal4 UAS-GFP/UAS-hth* mantiene la represión de *Wg* (Fig. 16E), y produce una reducción variable de sus niveles de expresión en hembras (Fig.16F).

Para estudiar si *hth* y *exd* reprimen a *wg* actuando como cofactores de *Abd-B*, o si su efecto es independiente de esta proteína, hemos analizado el efecto del silenciamiento de *hth* en fondos genéticos que reducen o eliminan *Abd-B*. En machos del genotipo *761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}* *Wg* expresa en el A7 (Fig. 16G), pero en el genotipo *UAS-hth/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}* no se da tal expresión (Fig. 16H). Finalmente, decidimos estudiar si en

machos del genotipo *UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}* o en hembras *UAS-hth RNAi/+; 761-Gal4, UAS-GFP/Abd-B^{M1}* ocurría algún cambio en la expresión de Wg (Figs. 16I y 16J). En los dos casos se expresa Wg en el A7.

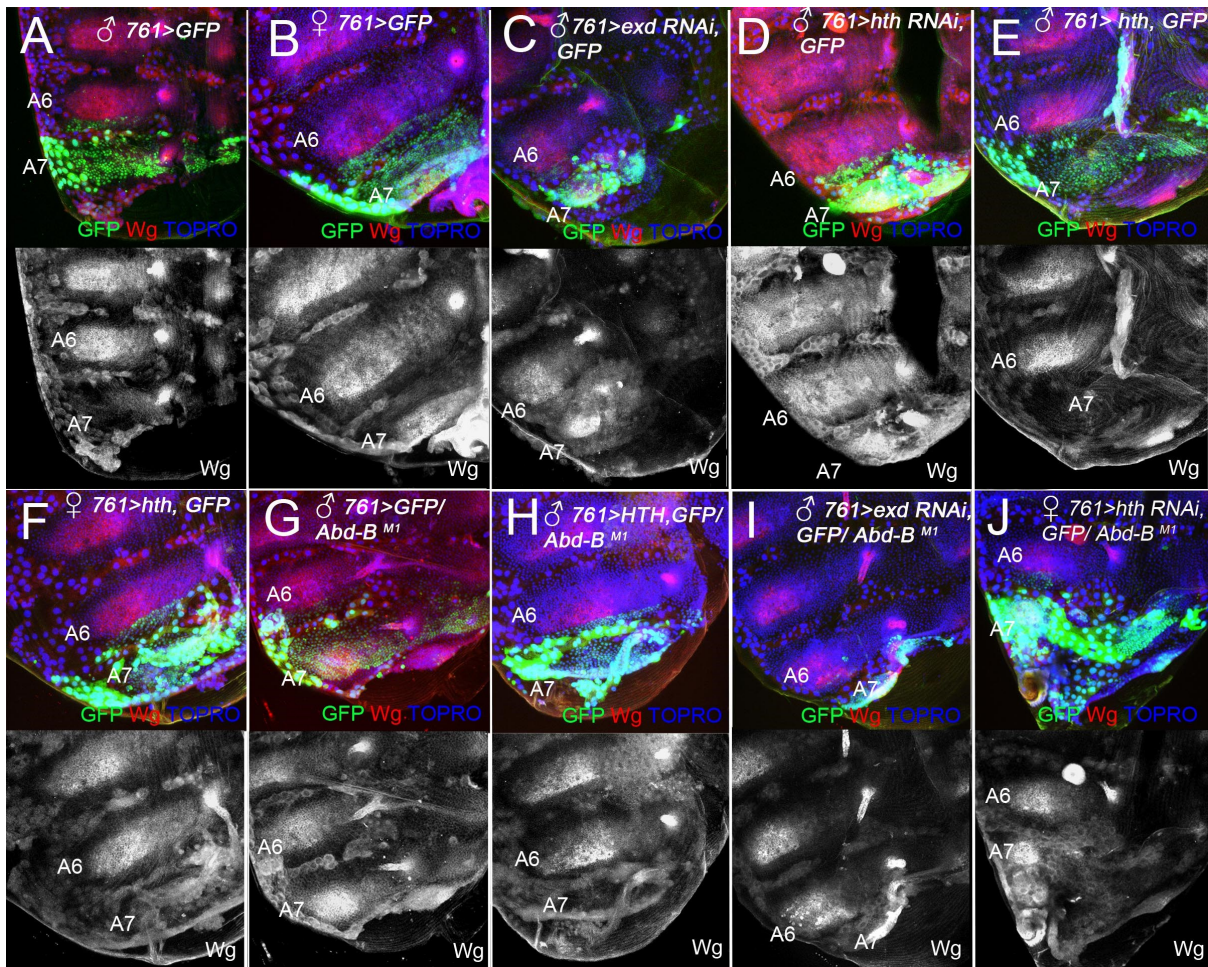


Figura 16. Regulación de *wg* por *exd/hth*. Se muestran tinciones contra Wg en pupas macho y hembra de 22 h. DFP. A) macho *761-Gal4 UAS-GFP/+*. B) hembra *761-Gal4 UAS-GFP/+*. C) macho *761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-exd RNAi*. D) macho *761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-hth RNAi*. E) macho *761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-hth*. F) hembra *761-Gal4 UAS-GFP/ UAS-hth*. G) macho *761-Gal4 UAS-GFP/ Abd-B^{M1}*. H) macho *UAS-hth/+; 761-Gal4, UAS-GFP/ Abd-B^{M1}*. I) macho *UAS-exd RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/ Abd-B^{M1}*. J) hembra *UAS-hth RNAi/+; 761-Gal4 UAS-GFP/ Abd-B^{M1}*.

4.II. 6. 2 Regulación de *bab*

El locus *bab* contiene dos genes, *bab1* y *bab2*, homólogos funcionales y con una expresión semejante (Couderc et al., 2002). *bab1* se expresa en el abdomen anterior de ambos sexos, pero en la región posterior tiene una expresión dimórfica: su expresión en el A5 y A6 de los machos se encuentra reprimida por Abd-B y DsxM mientras que está activada en esos mismos segmentos y el A7 de las hembras por Abd-B y DsxF (Williams et al., 2008). Hemos analizado de nuevo la expresión silvestre en el A7, encontrando que *bab2* no se expresa en este segmento de los machos (Fig. 17A), y confirmando la expresión descrita en las

hembras (Fig. 17B).

Para analizar la regulación de *hth* sobre *bab*, hemos inducido clones *hth*^{P2} en la epidermis pupal y visualizado la expresión de Bab2 (Fig. 17C). En general se observa una disminución de la expresión de Bab2. En pupas hembras de 26h. DFP, la reducción de la expresión de *exd* dirigida por la línea *pnr-Gal4* también produce una disminución de la expresión de Bab1 (se muestra el A4, Fig. 17D).

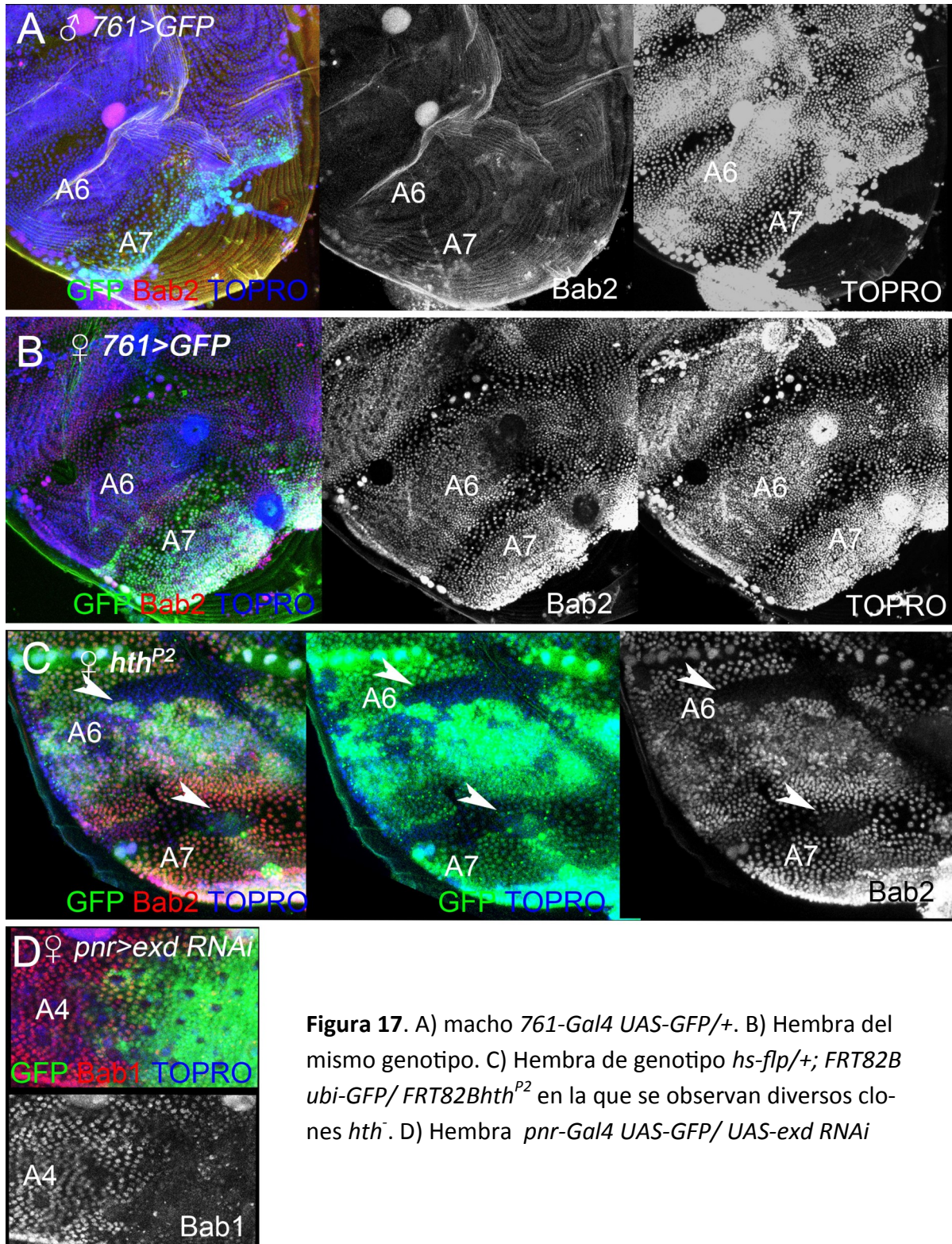


Figura 17. A) macho 761-Gal4 UAS-GFP/+. B) Hembra del mismo genotipo. C) Hembra de genotipo *hs-flp/+; FRT82B ubi-GFP/ FRT82Bhth*^{P2} en la que se observan diversos clones *hth*⁻. D) Hembra *pnr-Gal4 UAS-GFP/ UAS-exd RNAi*

4.II.7 Requerimiento de *exd* y *hth* en la genitalia de la hembra

4.II.7.1 Morfología de la genitalia de la hembra en el genotipo silvestre

La genitalia femenina es una estructura que proviene del segmento A8 del disco genital, situado en la región ventral del mismo (Nöthiger et al., 1977; Schüpbach et al., 1978). Se compone de dos placas genitales, que en su borde central, limitando con la abertura de la vagina, tienen cada una de ellas una fila de cerdas modificadas llamadas “dientes vaginales” (ver flechas en Figura 18A). Los dientes vaginales son quetas modificadas, más cortos y gruesos que las cerdas que se encuentran en diversas posiciones del adulto.

4.II.7.2 Fenotipo de *Abd-BGal4^{LDN}/Abd-B^{M1}* en la genitalia femenina

En hembras de genotipo *Abd-BGal4^{LDN}/Abd-B^{M1}* (Fig. 18B), las placas genitales y los dientes vaginales desaparecen, y son substituidos bien por una fina membrana, o bien por un esternito con cerdas, asemejándose a los esternitos de segmentos abdominales anteriores, pero con menos cerdas y más pequeño. El T8 aumenta de tamaño, incrementándose su número de cerdas y el tamaño de la banda pigmentada posterior.

4.II.7.3 Requerimiento de *hth* y *exd* en la genitalia femenina

Exd y Hth se expresan en todo el disco genital de hembra excepto en el A10, que formará la analia, aunque no de forma uniforme, con mayores niveles en la zona ventral del A8, que da origen a la genitalia externa, y en el segmento A9, que origina parte de la genitalia interna (Estrada y Sánchez-Herrero, 2001). Los clones de pérdida de *hth* en la genitalia femenina producen dientes vaginales ectópicos que se disponen desordenadamente, y en general cerca de los silvestres (Estrada y Sánchez-Herrero, 2001). Los clones de pérdida de *exd* tienen el mismo efecto (Fig. 5A de Rauskolb et al, 1995). Hemos expresado construcciones RNAi de *hth* y *exd* bajo control UAS en el disco genital de hembra con la línea *Abd-B-Gal4^{LDN}* y hemos obtenido un fenotipo semejante al descrito: un aumento del número de dientes vaginales ectópicos y desordenados (Fig. 18D, E). El experimento contrario, la sobreexpresión de Hth, de Exd, o de Exdnls con la misma línea produce la pérdida de los dientes y placas vaginales, y la transformación de la genitalia en esternito (Fig. 18C). Por tanto, como ocurre en el abdomen posterior, la expresión aumentada de *hth* o *exd* produce fenotipos similares a los de la pérdida de función de *Abd-B*. Los clones mutantes para *Abd-B* pueden transformar la genitalia en una pata o antena (Estrada y Sánchez-Herrero, 2001), pero los clones inducidos tardíamente en los primordios de los dientes vaginales, o la expresión de *Abd-B RNAi* en los mismos, transforma dichos dientes en cerdas (D. Foronda y E. Sánchez-Herrero, comunicación personal).

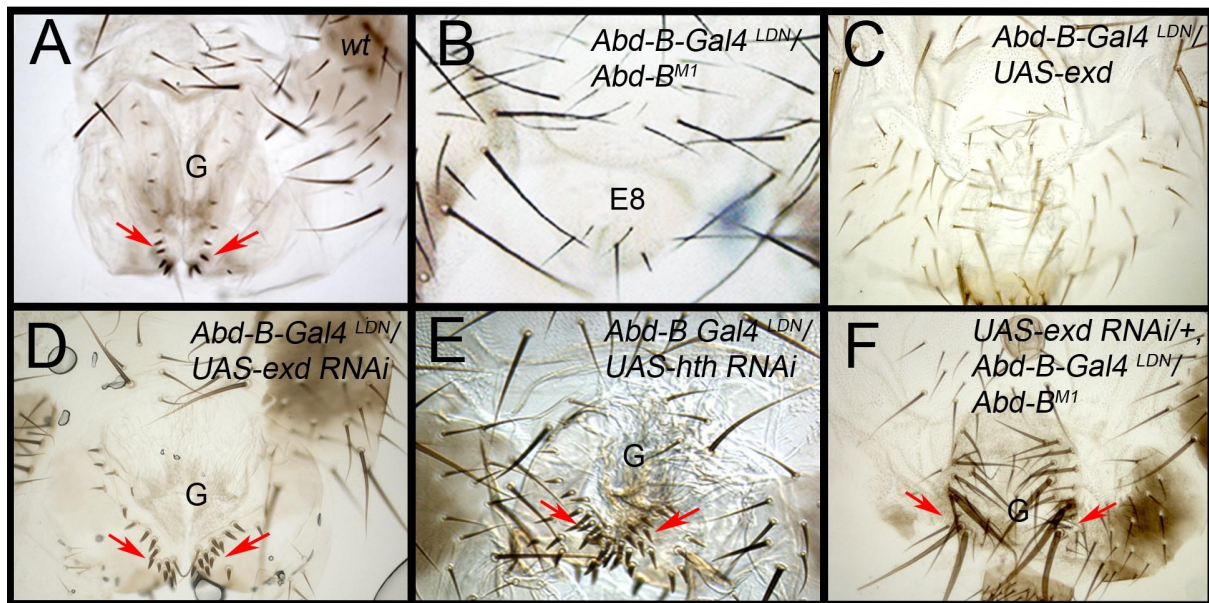


Figura 18. Requerimiento de *hth* y *exd* en la genitalia femenina. A) Genitalia de genotipo silvestre (*wt*). B-F) Genitales de los siguientes genotipos: *Abd-B-Gal4^{LDN}/Abd-B^{M1}* (B), *Abd-B-Gal4^{LDN}/UAS-exd* (C), *Abd-B-Gal4^{LDN}/UAS-exd RNAi* (D), *Abd-B-Gal4^{LDN}/UAS-hth RNAi* (E) y *UAS-exd RNAi/+; Abd-B-Gal4^{LDN}/Abd-B^{M1}* (F). Las flechas indican los dientes vaginales, y se señalan también la genitalia (G) o el esternito octavo (E8).

4.II.7.4 Interacciones entre *exd* y *Abd-B*

Cuando en el fondo mutante *Abd-B-Gal4^{LDN}/Abd-B^{M1}* reducimos la expresión de *exd*, reaparecen las placas vaginales, los dientes vaginales aumentan de número, adquieren una morfología mas propia de cerdas (son mas gruesos y largos), y se vuelven a ordenar en dos filas a ambos lados de la genitalia femenina (Fig. 18F). Estos resultados sugieren que la falta de genitalia en mutantes *Abd-B* podría deberse a un aumento de la expresión o actividad de *exd*.

4.II.7.5 Expresiones de *sc* y *hth* en el disco genital

Debido al papel de *hth* y *exd* en la regulación del número de dientes vaginales, decidimos estudiar si el patrón de expresión de *hth* podía estar implicado en la limitación del territorio presuntivo de dientes vaginales. *neuralized* (*neu*) es un gen proneural necesario para la formación de cerdas, y por lo tanto debe marcar las células que formarán los dientes vaginales, que son quetas modificadas (Yeh et al., 2000). Hemos confirmado esta suposición realizando una tinción del marcador *neu^{LacZ}* en estadio de farato (inmediatamente antes de la eclosión del adulto), que señala todos los núcleos de los dientes vaginales (Fig. 19B). Sin embargo, no hemos conseguido una buena tinción de inmunofluorescencia de este marcador en larva III, por lo que hemos utilizado un anticuerpo contra el gen proneural *scute* (*sc*) para marcar estas células, ya que *sc* marca las células que van a diferenciar cerdas (Modolell y Campuzano, 1998).

Una vez que confirmamos que *sc* era un marcador apropiado de los dientes vaginales, decidimos estudiar su expresión en relación a la de *hth* (Fig. 19A). En la tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra *Sc* en el disco genital de larva III, se observa que marca dos grupos de células: un grupo de 5-10 células, cercano al eje dorsoventral del disco, que en el mapa de destino forman parte del territorio presuntivo de los dientes vaginales (Epper, 1983), y un segundo grupo, más reducido (3-5 células), que se encuentra en una zona lateral del disco y, según el mapa de destino, formará las quetas del T8 (Epper, 1983). *Sc* y *Hth* colocalizan en un territorio que está en el borde del dominio de expresión de *hth*. El dominio *Sc* no está rodeado por niveles más altos de *Hth*, y, por lo tanto, no parece que *hth* sea el factor que limite su expresión, aunque habría que estudiar si los dientes vaginales extra que se observan al reducir la expresión de *hth* o *exd* se corresponde con la expresión ectópica de *sc*.

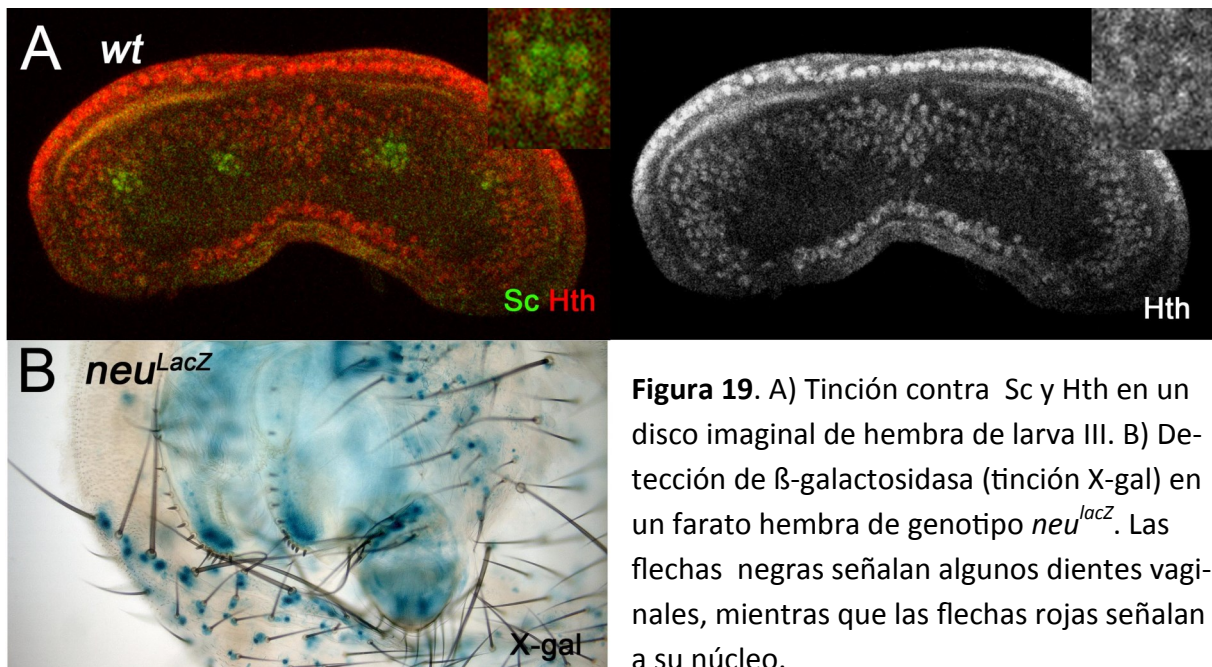


Figura 19. A) Tinción contra *Sc* y *Hth* en un disco imaginal de hembra de larva III. B) Detección de β -galactosidasa (tinción X-gal) en un farato hembra de genotipo *neu^{lacZ}*. Las flechas negras señalan algunos dientes vaginales, mientras que las flechas rojas señalan a su núcleo.

PARTE III. INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA ENTRE ABD-B Y EXD/HTH

4.III.1 Introducción

En vertebrados se ha descrito la interacción de un parólogo de Abd-B con Pbx (Exd en *Drosophila*) (Shen et al., 1997). En *Drosophila*, *Abd-B* reprime la expresión de *hth-exd* en el embrión (Azpiazu y Morata, 1998; Sambrani et al., 2013; Rivas et al., 2013), por lo que los niveles de Exd y Hth en la región posterior del embrión son muy reducidos. Sin embargo, en los resultados expuestos en los capítulos anteriores hemos visto que tal interacción podría ocurrir en el abdomen de *Drosophila*. Para analizar si tal interacción tiene lugar en la mosca del vinagre, realizamos dos tipos de experimentos: Complementación Bimolecular de Fluorescencia y Co-inmunoprecipitación.

4.III.2 Complementación Bimolecular de Fluorescencia (CBiF)

Hemos utilizado el método CBiF (Kerppola, 2008; Hudry et al., 2011) para estudiar la interacción *in vivo* entre Abd-B y Exd. Para ello, hemos utilizado dos construcciones que se traducen en las proteínas de interés, cada una de ellas unida a una mitad de la proteína fluorescente Venus (VN es la mitad N-terminal de Venus, y VC la C-terminal). Cada mitad de la proteína Venus no es fluorescente por sí sola, pero cuando se produce una interacción entre las dos proteínas que se analizan, si estas interaccionan, las dos mitades de la proteína Venus se acercan lo suficiente como para que se recupere su fluorescencia. Expresamos las dos proteínas fusión con la línea *pnr-Gal4*, que dirige la expresión en la zona central dorsal. En pupas de 22 h. DFP del genotipo *pnr-Gal4 tub-Gal80^{ts}/UAS-Abd-B::VC; UAS-VN::Exd/UAS-lacZ*, la fluorescencia se recompone en los histoblastos de la región dorsal central, de forma similar en el T5, T6 y T7 (y segmentos anteriores) (Fig. 20A). Este experimento sugiere que hay interacción *in vivo* entre las proteínas Abd-B y Exd. Sin embargo, cuando sobreexpresamos proteína Abd-B “fría” para “titular” la interacción entre Abd-B::VC y VN::Exd (*pnr-Gal4 tub-Gal80^{ts}/UAS-Abd-B::VC; UAS-VN::Exd/UAS-Abd-B*) la fluorescencia no varía significativamente (Fig. 20B). En el primer experimento, observamos que la fluorescencia se recompone en los nidos de histoblastos pero no en las células larvianas (Fig. 20C). En el A5, donde hay niveles muy bajos de Abd-B endógeno, la tinción con anti-Abd-B marca la expresión de la construcción de bifluorescencia dirigida por el activador *pnr-Gal4*. Se puede observar que en las células larvianas que tienen niveles muy altos de Abd-B (ver flecha en Fig. 20C), no se ha recompuesto la fluorescencia. Por lo tanto, parece haber un comportamiento diferente en los histoblastos y en las células larvianas, quizás debido a que estas últimas son politénicas, con muchas copias del gen *Abd-B*. Hemos ensayado si la proteína Abd-B^{W>A}::VC perdía su capacidad para reconstituir la bifluorescencia en los histoblastos, pero no hemos encontrado diferencias (resultado no mostrado), de forma concordante con lo descrito en el embrión (Rivas et al., 2013)

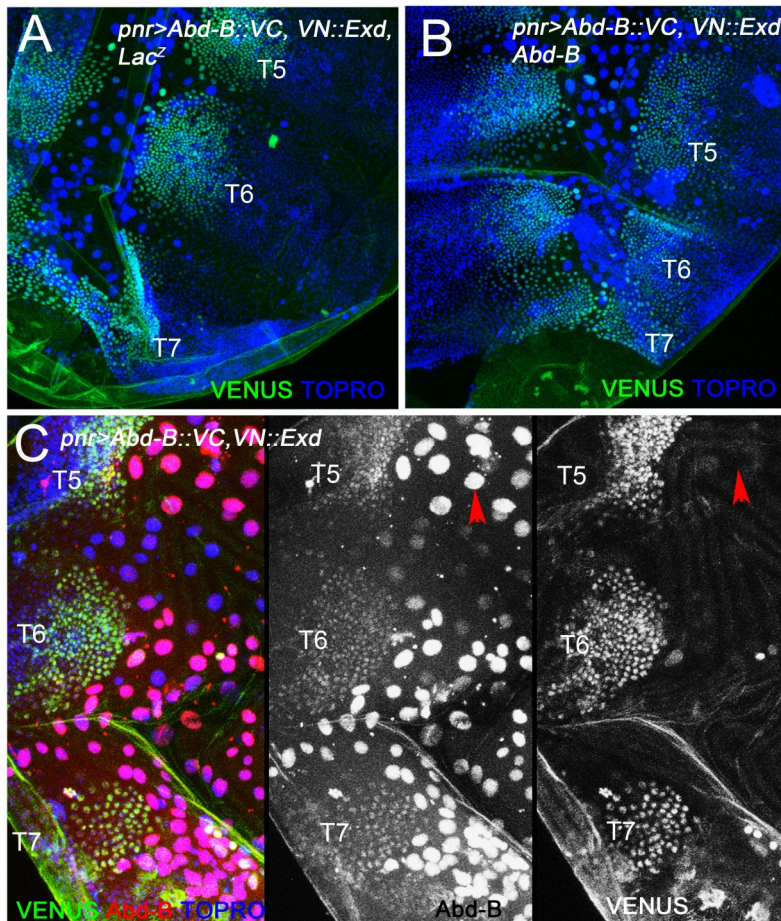


Figura 20. Complementación bimolecular de Fluorescencia (CBiF). A) Corte lateral mostrando la región dorsal de una pupa de 22 h. DFP de genotipo *pnr-Gal4 tub-Gal80^{ts}/UAS-Abd-B::VC; UAS-VN::Exd/UAS-lacZ* B) Experimento similar en el que se substituye *UAS-lacZ* por *UAS-Abd-B*. La fluorescencia no se reduce de forma significativa. C) *pnr-Gal4 tub-Gal80^{ts}/UAS-Abd-B::VC; UAS-VN::Exd/UAS-lacZ*. Las flechas rojas indican señal fuerte de Abd-B en células larvarias pero éstas carecen de señal de fluorescencia.

4.III.3 Análisis de interacciones entre Abd-B, Exd y Hth por coimmunoprecipitación

En la primera parte de los Resultados, se describen las modificaciones de la actividad de la proteína Abd-B cuando se mutan o se modifican distintos dominios y residuos de su secuencia. Con el objetivo de determinar si existe interacción Abd-B/Exd o Abd-B/Hth y si las modificaciones de la actividad de Abd-B que estábamos obteniendo se debían a la pérdida de interacción con Exd-Hth, hemos realizado experimentos de coimmunoprecipitación (en adelante, coIP). En primer lugar, hemos clonado en un sistema de expresión baculoviral vectores que permiten la expresión de proteínas con los epítopos específicos Flag, Histidina (His) y Hemaglutinina (HA): Flag-Hth, His-Exd, y HA-Abd-B. Hemos infectado con ellos células SF9 y realizado extractos de proteínas por separado. Debido a la mayor estabilidad del dímero Hth-Exd, hemos realizado un extracto con estas dos proteínas mediante una infección doble. Seguidamente, hemos ensayado las condiciones óptimas para la inmunoprecipitación. Los mejores resultados los hemos obtenido utilizando una resina acoplada a anticuerpo anti-Flag.

En la colP con los tres elementos Flag-Hth, His-Exd y HA-Abd-B (ver Fig. 21A), se observa que los tres se unen a la resina de forma específica, ya que la unión no ocurre en el control negativo sin Flag-Hth (Fig. 21B). En la colP con dos elementos, Flag-Hth y HA-Abd-B, (Fig. 21C), aunque la unión de Flag-Hth a la columna es fuerte, la mayor parte de HA-Abd-B no se une a él (compárese la cantidad de Abd-B eluída (E) respecto a la “sobrante” (S) en los paneles A y C. En el control negativo (Fig. 21B y 21D) no hay eluído de HA-Abd-B, por lo que aunque la unión de Abd-B unida a Hth en C, aunque pequeña, debe ser específica. Comparando las colPs con y sin His-Exd (Fig. 2A y 2B, respectivamente), se puede concluir que, en nuestras condiciones experimentales, la mayor parte de la proteína Abd-B se une a Hth en presencia de Exd, si bien una cantidad marginal de Abd-B es capaz de unirse independientemente.

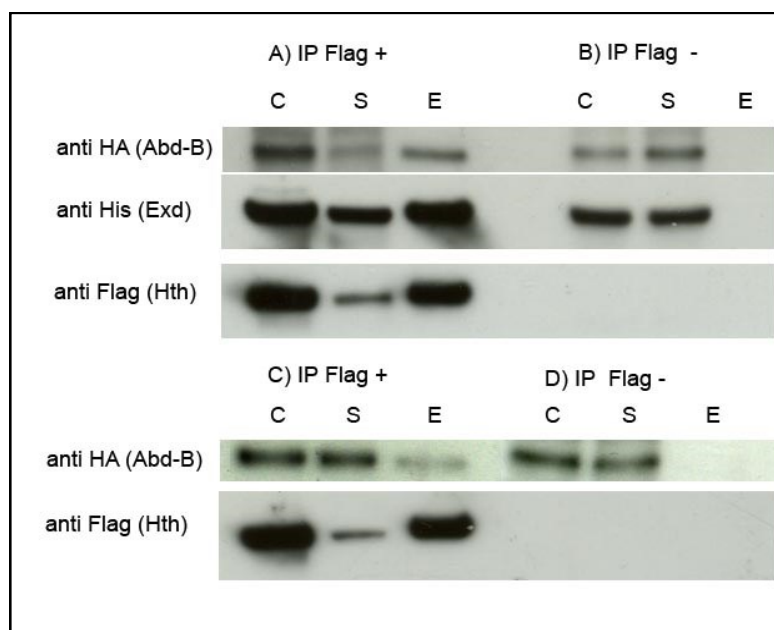


Figura 21. Se muestran cuatro colPs con anti-Flag (A, B, C y D). La columna C señala la “Carga” (“Input” en inglés), la mezcla con la que se realiza la IP. La columna S señala el “Sobrante” (“Flowthrough” en inglés), la mezcla al salir de la columna después de haberse incubado con ésta. La columna “E” es el eluído, que obtenemos hirviendo la columna en buffer de carga. En los Western Blots, HA-Abd-B se visualiza con un anticuerpo contra HA, His-Exd con uno contra His, y FLAG-Hth con uno contra Flag. A) es la IP con los tres elementos, y B) es su control negativo, sin Flag-Hth (ver columna C). C) es la inmunoprecipitación de Flag-Hth y HA-Abd-B, y D es su control negativo, sin Flag-Hth.

4.III.3.1 Efectos de mutaciones en la proteína Abd-B sobre la unión a Exd/Hth.

Seguidamente, pasamos a ensayar el efecto de las mutaciones Abd-B^{W>A}, Abd-B^{S>A}, Abd-B^{QR>QAA}, y Abd-B^{W>A, QR>QAA} en la unión a Exd y Hth. Decidimos ensayar el doble mutante Abd-B^{W>A, QR>QAA} en base a los resultados de los reemplazamientos funcionales que sugerían que ambos sitios (W y QR) podrían mediar la interacción con Exd, y que por tanto había una posibilidad de que la mutación de uno de ellos no fuese suficiente para evidenciarla. También incluimos en el experimento a la construcción que modifica la S del “linker” ya que es un aminoácido conservado en un dominio que podría afectar a la unión de las dos proteínas. En la Fig. 22 se pueden observar los resultados, ordenados en cinco columnas, de las cuales la primera es el control negativo, que no tiene FLAG-Hth, la segunda es el control positivo, con HA-Abd-B, la tercera tiene Abd-B^{W>A}, y las siguientes tienen Abd-B^{S>A},

Abd-B^{QR>QAA}, y Abd-B^{W>A, QR>QAA}. La parte superior del panel muestra la carga, y se puede observar que la cantidad de proteína de cada variante de HA-Abd-B que se carga en cada en cada IP es similar, y lo mismo ocurre con Flag-Hth y con His-Exd. En la zona inferior, se visualizan las eluciones de las colIPs. En la primera columna está la elución del control negativo, que no muestra señal con ninguno de los anticuerpos. Por lo tanto, la unión de Abd-B y de Exd a la columna ocurre a través de Hth, por lo que los resultados son específicos. En la segunda columna, se encuentra el control positivo, que muestra señal de las tres proteínas. Esto significa que Flag-Hth se ha unido al anti-Flag de la columna, y a él His-Exd y HA-Abd-B. En la IP de HA-Abd-B^{W>A} o en la de HA-Abd-B^{W>A, QR>QAA} se une aproximadamente un 50% menos de Abd-B a Hth y Exd que en el control positivo, mientras que el resto de proteínas permanecen constantes. HA-Abd-B^{S>A} y HA-Abd-B^{QR>QAA} se comportan igual que el control positivo. Estas colIPs se han repetido de forma independiente tres veces, obteniéndose resultados similares. Los resultados sugieren que cuando se muta el W del HX a A en la proteína Abd-B, ésta se une con mucha menos eficiencia a Exd (los resultados del experimento anterior sugieren que una cantidad mínima de Abd-B también puede unirse a Hth, sin que esté Exd).

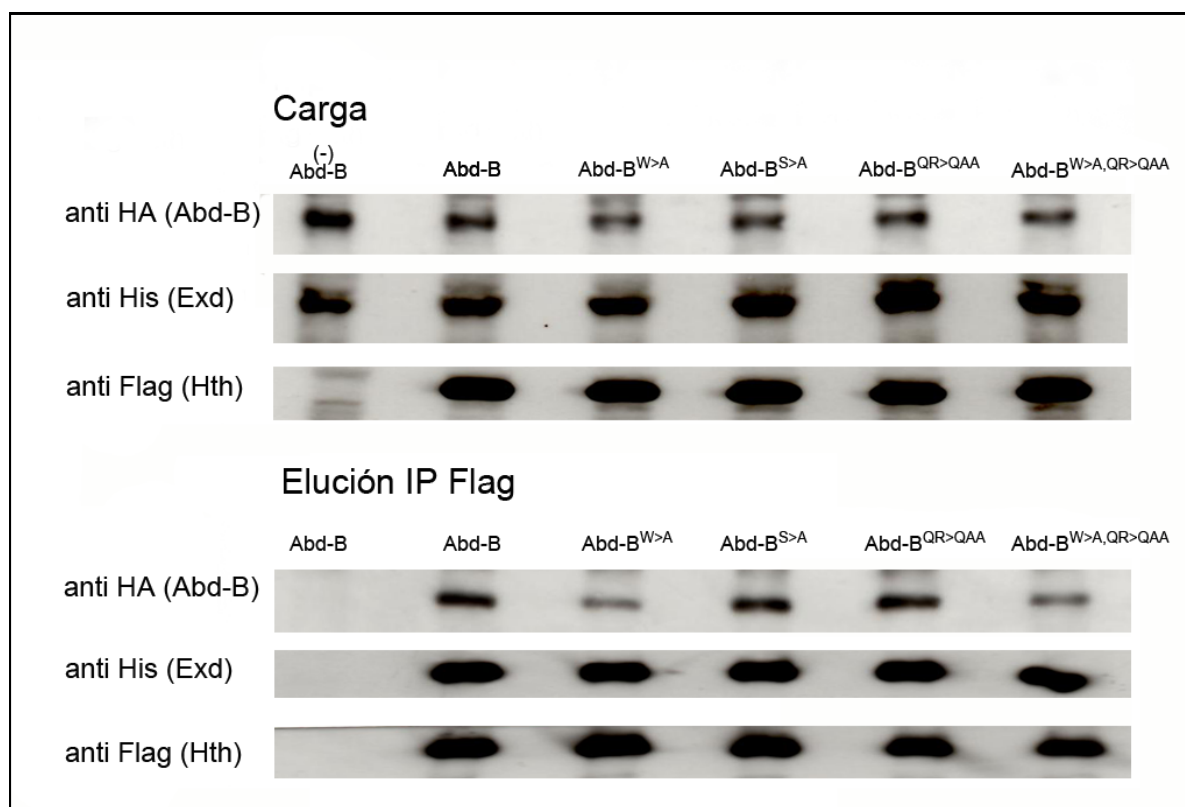
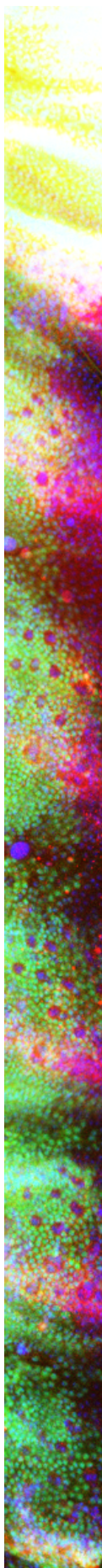


Figura 22. CoIP de variantes de HA-Abd-B, His-Exd y Flag-Hth con resina anti-Flag. En la zona superior se muestra la carga, y en la inferior, el eluido. Las columnas corresponden a las diferentes CoIPs, correspondiéndose la carga con el eluido. La primera columna es el con-



DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1 Función de los diferentes dominios de la proteína Abdominal-B

5.1.1 Introducción

La actividad principal de las proteínas Hox es como factores de transcripción, uniéndose al DNA para regular la expresión de genes que determinan la identidad de los segmentos. Su actividad *in vivo* es muy específica, siendo capaces de producir morfologías muy diferentes en los diferentes segmentos (Kaufman et al., 1990; Maeda y Karch, 2006; Wedeen et al., 2013). Sin embargo, las proteínas Hox tienen una secuencia bastante conservada en algunas regiones, especialmente en el homeodominio (Gehring et al., 1994). Una posibilidad es que la interacción con cofactores aumente la especificidad, siendo Exd (Pbx en vertebrados) el cofactor mejor descrito (Mann and Chan, 1996; Moens and Selleri, 2005). Sin embargo, el motivo mejor conocido de interacción con Exd, el Hx, se encuentra bien conservado en todas las proteínas Hox salvo en Abd-B y sus parálogos en vertebrados, en los que solo presenta el W central (Knoepfer et al., 1995; Shanmugam et al., 1997; Shen et al., 1997; LaRonde-LeBlanc y Wolberger, 2003; Hudry et al., 2012; Sambrani et al., 2013) por lo que tampoco puede explicar las diferencias entre las diferentes proteínas Hox.

Los avances en genómica han permitido obtener la secuencia de los genes que codifican proteínas Hox de multitud de especies, permitiendo comparar sus secuencias parálogas, detectando así los motivos conservados. Una segunda comparación con los genes o proteínas Hox de la misma especie permite distinguir los motivos comunes de los específicos. Estos últimos son los candidatos a ser funcionalmente relevantes en la especificidad de las proteínas Hox (Merabet et al., 2010). Además de algunos trabajos previos a esta metodología, que relacionaban diferentes motivos de la proteína con la función (Mann y Hogness, 1990; Lin y McGinnis, 1992; Zeng et al., 1993; Johnson et al., 1994; Lu et al., 1995; Passner et al., 1999). Recientemente se han descubierto diversos motivos de proteínas Hox implicados en la especificidad (revisado en Rezsohazy et al., 2015). Estos son el Hx, que a pesar de ser similar en muchas proteínas Hox, forma una unidad de especificidad junto con otras secuencias que sí que varían: el “linker”, y el brazo N-terminal del homeodominio (Joshi et al., 2007; 2010; Saadaoui et al., 2011; Abe et al., 2015). Por otra parte, otras secuencias de algunas proteínas Hox como el motivo UbdA (Merabet et al., 2007), el motivo TDWM (Lelli et al., 2011, Hudry et al., 2012), y el motivo RRDR (Lelli et al., 2011) se han relacionado con el cofactor Exd, aunque para alguno de ellos también se ha descrito un papel independiente (Merabet et al., 2011).

En Abd-B se han localizado diversos motivos conservados en proteínas parálogas de distintas especies que pueden estar implicados en la especificidad: El W conservado en el

Hx, el “linker”, que se encuentra muy reducido respecto a otras proteínas Hox, el brazo N-terminal, que presenta un motivo (KRKP) diferente del que hay en las otras dos proteínas Hox del C-BX, y el motivo QRQA situado C-terminal al homeodominio (Merabet et al., 2009; Sambrani et al., 2013). De éstos, solo los motivos KRKP y QRQA se han mostrado necesarios para la actividad de Abd-B en la represión de *Dll*, una actividad que no requiere Hth o Exd (Sambrani et al., 2013). Por otra parte, la mutación de las posiciones N51 y Q50 del homeodominio, que en base a resultados de cristalografía, son las responsables de la unión de HoxA9 -Pbx1 al DNA (LaRonde-LeBlanc y Wolberger, 2003), provoca la pérdida total de actividad de Abd-B en la represión de *Dll* (Sambrani et al., 2013).

Hemos analizado el efecto de diferentes mutaciones y reemplazamientos en la actividad de Abd-B sobre cuatro caracteres, uno genérico (ya que otras proteínas Hox lo realizan también; Weatherbee et al., 1999), la represión de *Q-vg^{LacZ}*, y otros específicos de Abd-B, la inducción de espiráculos posteriores ectópicos, la represión del A7 en machos, y la formación de la genitalia femenina. Comentamos a continuación los efectos sobre los mismos de cambios en distintos dominios de la proteínas Abd-B.

5.1.2 Región del Hexapéptido y del “linker”

Llamamos a la secuencia que incluye el W situado en posición homologa al Hx de otras proteínas con esta misma denominación, aunque no es propiamente un motivo Hx. Las proteínas *Abd-B^{W>A}*, *Abd-B^{TG>AA}*, y *Abd-B^{EWGTG>AAAA}* son capaces de reprimir completamente a *Q-vg^{LacZ}* (Fig. 2D-F de Resultados), lo que indica que su actividad genérica no se ve afectada. Estos mutantes también son capaces de inducir espiráculos posteriores ectópicos en el embrión. *Abd-B^{W>A}* especialmente, pero también *Abd-B^{TG>AA}*, inducen más dientes vaginales que sus rescates control, mientras que *Abd-B^{EWGTG>AAAA}*, que incluye las dos mutaciones anteriores, no es capaz de inducirlos. Por lo tanto, parece que los aminoácidos WTG tienen un papel en la regulación negativa del número de dientes vaginales, pero que la mutación de la secuencia completa (EWGTG) genera una proteína que no es capaz de inducirlos. Esto sugiere que este motivo podría tener una doble función en la especificación de los dientes vaginales, tal vez mediada por el aminoácido ácido Glutámico (E). Cuando analizamos el papel de la región Hx en la morfogénesis del A7 encontramos que la proteína Abd-B (ZH35) rescata parcialmente el fenotipo mutante en el A7 de los machos (Fig. 4D, Tabla 2), pero que *Abd-B^{W>A}* es capaz de rescatarlo completamente (Fig. 4E, Tabla 2). *Abd-B^{TG>AA}* y *Abd-B^{EWGTG>AAAA}* también producen una represión total, al igual que su control *Abd-B* (1.1) (Fig. 4C, F, G, Tabla 2).

Es interesante que tanto en el rescate de los dientes vaginales como de la supresión del A7 la proteína *Abd-B^{W>A}* parece tener más actividad que la proteína silvestre Abd-B (ZH35), aunque las construcciones UAS que las expresan se encuentran situadas en el mismo locus genómico (ZH35). Se podría argüir que la supresión del A7 podría ser debida a un

efecto inespecífico de la proteína (que impida la división celular o provoque muerte celular), pero la presencia de dientes vaginales en la genitalia femenina de la proteína mutante sugiere que ésta funciona más activamente que la silvestre. Por otra parte, experimentos de cristalización del dímero Hox/Pbx1 han demostrado que este aminoácido forma interacciones extensas con Pbx1 (Piper et al., 1999) y que la mutación de este W elimina la cooperación Hox/Exd(Pbx1) (Johnson et al., 1995; Chang et al., 1995; Shen et al., 1996). Por tanto, si la función de la proteína mutante es mejor, sugiere que el Hx reduce la actividad de la proteína nativa. Esta conclusión, sin embargo, solo puede aplicarse a los dos caracteres mencionados, ya que la proteína *Abd-B*^{W>A} puede formar espiráculos posteriores ectópicos, reprimir *Q-vg* y reprimir *Dll* (Sambrani et al., 2013). Quizás es significativo que estas tres funciones no requieren Exd ni Hth.

Las proteínas que incluyen las deleciones *Abd-B*^{N5} (deleción N-terminal incluyendo el hexapéptido) y *Abd-B*^{N6} (en la que también se elimina éste) pierden, respectivamente, parcialmente y totalmente su capacidad para reprimir *Q-vg*^{lacZ} (Fig. 2G y H, Tabla 2) así como la capacidad para inducir espiráculos posteriores y formar dientes vaginales. La proteína *Abd-B*^{N5} conserva cierta actividad en la represión del A7 (Fig. 4I, Tab. 2). Este resultado sugiere que el Hx se requiere en cierta medida para la función de Abd-B en la represión del A7. Sin embargo, las mutaciones anteriores indicaban que esta región regulaba negativamente la represión del A7. Una posible explicación a esta paradoja es que el Hx juegue un papel diferente en la proteína silvestre y en la proteína *Abd-B*^{N5}. Sin embargo, es más probable que se trate de un efecto debido al tamaño de la región eliminada, como se ha observado en otras deleciones de proteínas Hox (Mann y Hogness, 1990).

Hemos analizado el efecto de los intercambios con el Hx de Ubx, *Abd-B*^{EWTG>YPWM} y con el Hx y el “linker” del mismo, *Abd-B*^{HxL Ubx}, con el objetivo de determinar si el motivo YPWM del Hx de Ubx pudiera ser homólogo funcionalmente al EWTG de Abd-B, y para analizar la contribución de la unidad funcional Hx-“linker” a la especificidad (Joshi et al., 2007; 2010, Saadaoui et al., 2011). Estos intercambios presentan respectivamente una represión total y una parcial, aunque significativa, de *Q-vg*^{lacZ}. (Fig. 2J, K, Tabla 2). Este último efecto indica una ligera reducción de su actividad general, por lo que parece que el “linker” de Abd-B es un factor importante para la actividad no específica de esta proteína. Hay que tener en cuenta que el “linker” de Ubx está compuesto por 42 aminoácidos, mientras que el de Abd-B solo de tres. Los aminoácidos del “linker” están poco conservados, pero sí que lo está su longitud, que se encuentra reducida en las proteínas Hox posteriores, siendo Abd-B la que presenta la reducción más extrema. Se ha propuesto que esta longitud es importante para la función de distintas proteínas Hox (In der Rieden et al., 2004; Merabet et al., 2009).

Ninguna de estas dos substituciones es capaz de inducir EP ectópicos, un carácter que está

regulado negativamente por Hth (Rivas et al., 2013), lo que sugiere que la región del Hx y el “linker” se requieren para este carácter. Sin embargo, el intercambio con el Hx de Ubx proporciona un rescate total en la supresión del segmento A7 y en la producción de dientes vaginales en los respectivos fondos genéticos mutantes. De nuevo, como en otros experimentos con los diferentes dominios de la proteína, existen cambios en los que se afectan unos caracteres pero no otros. Esta característica ha sido estudiada intensamente en la proteína Hox Scr y señalada anteriormente como diferente pleiotropía de proteínas Hox, que postula precisamente que motivos pequeños de estas proteínas pueden interaccionar con otras proteínas y especificar solo algunos de los caracteres que determina la proteína Hox (Sivanantharajah y Percival-Smith, 2014). El intercambio con el Hx y el “linker” de Ubx no es capaz, sin embargo, de reprimir totalmente el A7 del fondo mutante Abd-B (Fig. 4L, Tabla 2); sin embargo, en la genitalia femenina produce dientes vaginales, con una identidad intermedia entre diente vaginal y queta. Estos resultados se pueden deber a una combinación de efectos: por un lado, la pérdida de la actividad genérica de Abd-B, que observábamos en la represión de $Q\text{-vg}^{lacZ}$, puede ser responsable tanto de la falta de represión del A7, como de la morfología intermedia de los dientes vaginales. El aumento del número de dientes vaginales se podría deber a la pérdida de efectividad de la interacción con Exd y Hth.

La mutación en la S del “linker”, $Abd\text{-}B^{S>A}$, no afecta a la represión de $Q\text{-vg}^{lacZ}$ (Fig. 2L, Tabla 2), a la inducción de espiráculos posteriores, a la represión del A7 (Fig. 4K, Tabla 2), ni a la represión de *Dll* (Sambrani et al., 2013), pero no es capaz de inducir la formación de dientes vaginales. Este resultado podría deberse a un hipotético papel regulador de la fosforilación de la serina del “linker” en la función de esta proteína, aunque exclusivamente para este carácter. Se conoce que la proteína Hox Antp cambia su función cuando está fosforilada (Jaffe et al., 1997) y que Ubx es también una proteína con formas fosforilables (Gavis y Hogness, 1991).

5.1.3 Brazo N-terminal del homeodominio

La proteínas $Abd\text{-}B^{KK>AA}$ y $Abd\text{-}B^{KRKP>KRQT}$ reprimen completamente a $Q\text{-vg}^{lacZ}$ (Fig. 2M, N, Tabla 2), por lo que su actividad genérica no se ve afectada. Su actividad específica sí que lo hace: mientras que aquella proteína es capaz de inducir EP ectópicos, ésta no es capaz de hacerlo. Puesto que en la proteína $Abd\text{-}B^{KRKP>KRQT}$ hemos cambiado residuos de la proteína Abd-B que dan especificidad por los de Ubx, nuestros resultados sugieren que estos residuos no son fundamentales para el funcionamiento inespecífico de Abd-B, pero sí que lo son para especificar las diferencias con Ubx. Algo similar se observa en el rescate de la genitalia femenina, en el que la proteína con aminoácidos mutados a alaninas produce un número de dientes vaginales similar al control, mientras que el intercambio de aminoá-

cidos con los de Ubx produce un fenotipo mutante. Ambos resultados son similares a los publicados, en donde $Abd-B^{KK>AA}$ pierde en parte su capacidad para reprimir *Dll*, mientras que $Abd-B^{KRKP>KRQT}$ lo hace en mayor medida (Sambrani et al., 2013). En el rescate del A7 ocurre un fenómeno sorprendente. A pesar de que los niveles de expresión de $Abd-B^{KK>AA}$ y $Abd-B^{KRKP>KRQT}$ son similares a los del rescate control, los individuos con estas construcciones mueren durante la pupación temprana, por lo que hemos modificado las condiciones del experimento para reducir los niveles de expresión, en paralelo con un rescate control que presenta un rescate completo a semejantes niveles de expresión. En dichas condiciones, las dos variantes de Abd-B muestran un rescate parcial, y semejante entre sí, pero la letalidad sigue siendo muy alta, por lo que no es posible extraer conclusiones debido al pequeño número de casos obtenido. Es posible que la expresión de estas construcciones active apoptosis pero esto no se ha estudiado.

5.1.4 Hélice III del homeodominio

La hélice III del homeodominio de varias proteínas Hox contacta con el DNA a través de los aminoácidos I47, Q50 y N51 (Gehring, 1994). La importancia de estos mismos residuos, que están conservados en todas las proteínas Hox, ha sido confirmada en un estudio de cristalografía de un homólogo de Abd-B, HoxA9, en el que se especifica que la N51 es un residuo clave en la unión al DNA, y que interacciona de cuatro maneras con el DNA mientras que Q50 o I47 solo lo hacen de una (LaRonde-Leblanc y Wolberger, 2003). Consistentemente, la mutación del N51 en Ubx o en Exd impide su unión al DNA (Hudry et al., 2011). Se ha descrito que la mutación de Q50 o de N51 impide completamente la función de Abd-B en la represión de *Dll* (Sambrani et al., 2013), pero en nuestro caso solo hemos encontrado una pérdida total de función con $Abd-B^{N51>A}$ en los cuatro caracteres (Fig. 2O,4P, Tabla 2). En cambio, $Abd-B^{Q50>A}$ reprime completamente a $Q-vg^{lacZ}$ (Fig. 2N,4O Tab. 2) y no rescata el fenotipo mutante en la genitalia hembra, pero produce un rescate parcial del fenotipo en el A7. Estos resultados indican que $Abd-B^{Q50>A}$ es algo funcional, a diferencia de $Abd-B^{N51>A}$, que pierde totalmente su función. Sorprendentemente, la proteína mutante triple $Abd-B^{I47, Q50, N51>A,A,A}$ también es capaz de reprimir a $Q-vg^{lacZ}$ (Fig. 2P, Tabla2), aunque no produce EP ni rescata la genitalia femenina, y reduce muy ligeramente el A7 (Fig.4Q, Tabla 2).

Este resultado, que indica que la proteína mutante en N51 no reprime $Q-vg^{lacZ}$ pero la proteína $Abd-B^{I47, Q50, N51>A,A,A}$ sí lo hace en gran medida, no es fácil de explicar. Se podría deber a que la mutación completa de los determinantes en la hélice III de la unión al surco mayor del DNA incrementase la unión a través del brazo N-terminal del homeodominio en el surco menor (Joshi et al., 2007; 2009, Saadaoui et al., 2011; Abe et al., 2015). Sin embargo, en estos ejemplos se incrementa la unión al añadir proteína Exd, y en el “pouch” del disco de ala la proteína Exd es citoplásmica. Se podría quizás expresar conjuntamente la

proteína *Abd-B*^{I47, Q50, N51>A,A,A} con la proteína Exd dirigida al núcleo en el disco de ala y ver si la represión de *Q-vg*^{lacZ} incrementa o disminuye.

5.1.5 Región C-terminal adyacente al homeodominio

La mutación *Abd-B*^{QR>QAA} es funcional en todos los caracteres que hemos analizado (Tabla 2). Sin embargo, en la genitalia femenina produce más dientes vaginales que el rescate control. La mutación de este motivo produce una pérdida parcial de la represión de *Dll* en el embrión (Sambrani et al., 2013), por lo que este motivo puede requerirse para la función de la proteína de distinta forma según el carácter o el gen que se estudie.

5.1.6 Efecto de los intercambios de homeodominio

Diferentes experimentos de intercambio del Homeodominio se han llevado a cabo desde el original trabajo de Kuziora y McGinnis (Kuziora y McGinnis, 1989), que demostró un cambio de especificidad de la proteína Dfd al sustituir su homeodominio por el de Ubx. Algunos de los intercambios afectan a la capacidad de la proteína para interactuar con Exd (Johnson et al., 1995), mientras que otros no han demostrado ningún efecto en la formación de este complejo (Shen et al., 1996). En las proteínas del C-BX se ha demostrado que una proteína Ubx con el HD de Abd-A posee la especificidad de Abd-A en la determinación del patrón de dentículos del embrión (Chauvet et al., 2003) y que la proteína quimera Ubx con el HD de Abd-B posee características propias de la proteína Abd-B en su forma de reprimir *Dll* en el embrión (Sambrani et al., 2013). Tanto *Abd-B*^{IHD Ubx} como *Abd-B*^{IHD Abd-A} son funcionales en la represión de la diana genérica *Q-Vg*^{lacZ} (Fig. 2R, S, Tabla 2) pero no en la inducción de espiráculos posteriores, algo que sugiere que esa actividad podría estar especificada por el homeodominio de Abd-B. Ambos reprimen parcialmente el A7 (Fig. 4S, T, Tabla 2), *Abd-B*^{IHD Abd-A} lo hace de forma ligeramente menor que su control Abd-B (ZH35) mientras que *Abd-B*^{IHD Ubx} pierde en gran parte su capacidad represiva cuando se compara con su control. Esto, en principio, se podría relacionar con la mayor similitud del homeodominio de Abd-A con el de Abd-B. Sin embargo, *Abd-B*^{IHD Ubx} es capaz de especificar dientes vaginales, mientras que *Abd-B*^{IHD Abd-A}, al igual que su control (debido a los niveles de expresión menores), no es capaz de inducirlos. Un experimento necesario sería la comprobación del rescate con *Abd-B*^{IHD Abd-A} a 29°C, aunque en esas condiciones su rescate control tampoco es capaz de inducirlos (datos no mostrados). Una conclusión general de estos experimentos es que la inducción de EP depende de manera absoluta del homeodominio de Abd-B, la represión del A7 de machos depende de manera parcial, y la formación de dientes vaginales no lo hace. Por lo tanto, no toda la especificidad de Abd-B se encuentra en el homeodominio (el responsable de la unión al DNA), lo cual sugiere que Abd-B podría interaccionar con cofactores o elementos mediadores para especificar ciertos caracteres.

5.2 Función de Extradenticle y Homothorax en relación a Abdominal-B

5.2.1 Interacción de Abd-B y Exd a través del Hx

Como se ha comentado anteriormente, Abd-B y las proteínas homólogas solo conservan el triptófano en la región donde en otras proteínas Hox está el Hx. Solo se ha descrito en un caso la unión a Exd mediada por el W a Abd-B: en un experimento de retardo en gel utilizando un fragmento de una secuencia reguladora del gen *ciclina E*, se forma un complejo trimérico de Abd-B-Exd-Hth, que se reduce al mutar el W (Hudry et al., 2012). Dicha unión no ocurre en la secuencia reguladora de *Dll* (Sambrani et al., 2013) o en la de *ems* (Rivas et al., 2013), en las que Abd-B se une como monómero, y la adición de Exd y Hth impide la unión de Abd-B a dichas secuencias. No hay datos de la regulación *in vivo* de *ciclina E* por Abd-B, pero en los casos de *ems* y de *Dll*, los resultados son coherentes con los experimentos *in vitro*: Abd-B reprime a *hth* en el embrión, por lo que su expresión es muy baja o se encuentra ausente en el dominio *Abd-B*, y la sobreexpresión de *hth* bloquea la actividad de esta proteína Hox (Sambrani et al., 2013; Rivas et al., 2013). Por lo tanto, los dos tipos de regulación son posibles dependiendo de las dianas de las que se trate. En nuestros experimentos de inmunoprecipitación, hemos comprobado que Abd-B, Exd y Hth se pueden unir en ausencia de DNA, y que esa unión ocurre en parte a través del W del Hx, por lo que es posible que existan otras regiones implicadas. En experimentos de competición entre Abd-B y Exd y Hth para la unión a una secuencia reguladora de *ems*, *Abd-B^{W>A}* se comporta de manera similar a Abd-B silvestre cuando compite con Exd y Hth en la unión a secuencias de *ems* en experimentos de retardo en gel (Rivas et al., 2013). Esto quiere decir que en este caso, otro motivo de Abd-B debe estar mediando este proceso.

Algo similar se ha observado en experimentos de complementación molecular de bi-fluorescencia (CBiF), en los que la coexpresión de *UAS-Abd-B^{W>A}VC* y *UAS-VN Exd* es capaz de reconstituir la fluorescencia de la proteína Venus (Hudry et al., 2012) por lo que en este caso también debe haber otros motivos implicados en la unión de las dos proteínas. Nuestros experimentos indican que el W es importante para la interacción entre Exd y Abd-B, y que la mutación del W tiene un efecto en la actividad de esta proteína, por lo que es posible que la proteína Abd-B se una a Exd por diferentes motivos y que se obtengan diferentes resultados según las diferentes técnicas usadas. En el caso de CBiF es posible que la topología de los fragmentos usados pueda provocar algunas interacciones que tienen lugar menos frecuentemente en las proteínas nativas.

5.2.2 Regulación entre *Abd-B*, *exd* y *hth*.

En el embrión, *Abd-B* reprime la expresión de *hth* y la translocación al núcleo de Exd (Rauskolb et al., 1993; Kurant et al., 1998; Azpiazu y Morata, 1998; Sambrani et al., 2013; Rivas et al., 2013). Al forzar la expresión Hth en todo embrión se genera un fenotipo similar al de falta de función de Abd-B (Sambrani et al., 2013; Rivas et al., 2013), y lo mismo

ocurre en el abdomen adulto (Ryoo et al., 1999 y esta Tesis) o la genitalia femenina, lo cual apunta a que la regulación negativa de la actividad de *Abd-B* por *exd* y *hth* es general.

En las hembras, *Abd-B* reprime a *hth* en el A7, y la falta de *Abd-B*, por tanto, aumenta los niveles de Hth, de forma más evidente en estadios tardíos de la pupación. En los machos, la reducción de *Abd-B* provoca un efecto variable en estadios tempranos, normalmente una ligera disminución de los niveles de Hth en algunas células, aunque también hemos observado algunos casos (posiblemente de pupas ligeramente más tempranas) en que no se ve tal reducción. Cuando se elimina el A7 y después, la ausencia de *Abd-B* incrementa los niveles de Hth en el A7 (que normalmente desaparecería, pero que persiste en esta condición al faltar el gen Hox).

Las diferencias entre la función de *Abd-B* en hembras y machos podría deberse a los mayor niveles de expresión de *Abd-B* en el A7 de machos o, más probablemente, a la presencia en machos de proteína DsxM y en hembras de DsxF. *dsx* se expresa en todo el abdomen a niveles muy bajos, pero en el A7 su expresión aumenta de forma significativa debido a *Abd-B* (Wang et al., 2011; Foronda et al., 2012). La sobreexpresión de DsxM en el A7 de hembras incrementa Hth en el A7 mientras que la de DsxF en machos disminuye los niveles de Hth. Así mismo, en los clones en los que se transforma el sexo de hembras a machos (clones *tra RNAi*), los niveles de expresión de Hth aumentan, aunque no de manera homogénea, probablemente porque los niveles de expresión de la proteína Hth en este segmento del macho tampoco lo son.

Ya que *Abd-B* regula los niveles de *dsx* en el A7, y controla negativamente a *hth* en estadios intermedios y tardíos (20-26 h. DFP) de machos y hembras, estos resultados sugieren que los altos niveles de DsxM que hay en el A7 podrían contrarrestar la represión de *Abd-B* y elevar por tanto la expresión de Hth en gran parte de este segmento de machos durante el proceso que conduce a su eliminación, mientras que la ausencia de DsxM (unida quizás a la presencia de DsxF) hace que *Abd-B* se comporte como un represor de *hth*, más evidentemente en etapas tardías de la pupación. Este diferente comportamiento de *Abd-B*-DsxM y *Abd-B*-DsxF (o *Abd-B* solo) se ha propuesto igualmente para la regulación de *bab* en el abdomen posterior, reprimiendo este gen la primera combinación y activándolo la segunda (Williams et al., 2008).

Hemos descubierto que *hth* se requiere para el mantenimiento de la expresión de *Abd-B* y *abd-A* y que su sobreexpresión aumenta los niveles de *Abd-B*. Paradójicamente, en esta situación la actividad de *Abd-B* disminuye, como se revela por las transformaciones hacia segmentos anteriores (por ejemplo, de A7 en A4 al sobreexpresar *hth* en el A7). Esta regulación tiene aspectos similares con la descrita para *Ubx* en el disco imaginal de halterio, en el que la pérdida de *exd* produce una disminución de la expresión de *Ubx*, mientras que su sobreexpresión la incrementa (Azpiazu y Morata, 1998). Este hallazgo plantea la posibilidad de que el requerimiento de *Exd* para la expresión de las proteínas Hox del C-BX

sea general.

5.2.3 Función de *exd* y *hth* en el abdomen posterior

La reducción de la expresión de *hth* o *exd* en el segmento A7 al expresar construcciones RNAi para estos genes produce un pequeño segmento en machos y la reducción del mismo en hembras. Esto último podría interpretarse como una transformación hacia un segmento posterior. El incremento de la expresión de estos genes, por otra parte, transforma el segmento en uno anterior en hembras y causa la formación de un pequeño A7 (menor que en el caso anterior, al reducir *hth* o *exd*) en machos.

Estos fenotipos indican que *hth* se requiere de manera diferente en los dos sexos: en los machos, se requiere para la represión del A7, mientras que en las hembras evita la reducción excesiva del segmento. En ausencia de *Abd-B*, la falta de *hth* o *exd* reduce igualmente o más aún el segmento A7 en hembras y disminuye también el que aparece en machos. La falta de *Abd-B* no modifica las transformaciones hacia anterior de la ganancia de función de *hth*. En base a esos resultados, se podría pensar que la reducción del segmento A7 en hembras (y del A7 transformado a anterior en machos mutantes *Abd-B*) provocada por el silenciamiento de *hth* es independiente de este último. Sin embargo, los experimentos de inmunoprecipitación muestran que *Abd-B* interacciona con *Exd* en presencia de *Hth* al menos por el W del Hx, y la mutación de ese residuo produce una proteína que tiene una mayor capacidad para reprimir el A7 en ambos sexos. Es posible por tanto que la falta de *hth* o *exd* tenga dos efectos, aumentar la actividad de *Abd-B* y reducir el segmento independientemente de *Abd-B*, y que la conjunción de ambos resulte en el pequeño A7 que se observa en las hembras en esta condición mutante.

En el desarrollo del A7 de los machos la complejidad en la interacción *hth/exd* y *Abd-B* es seguramente mayor, ya que en ausencia de *hth/exd* aparece un pequeño A7. Más aún, la sobreexpresión de *hth* en este segmento no provoca una transformación hacia un segmento anterior completa como en las hembras, sino una muy reducida (un segmento A7 mínimo). Esto se podría deber a que los niveles de expresión de *Abd-B* son mayores en el A7 de los machos que en el de hembras, y, por lo tanto, pueden contrarrestar la inhibición producida por los niveles altos de *hth*. Cuando se reducen los niveles de *Abd-B* a los que hay en el A6, la sobreexpresión de *hth* produce el mismo efecto en machos y en hembras (una transformación hacia A4), lo que parece indicar que los niveles de *Abd-B* determinan que la sobreexpresión de *hth* produzca un efecto fenotípico claro o no. La presencia de estos mayores niveles y/o la de *DsxM* podría determinar igualmente que la ausencia de *hth/exd* de lugar a un pequeño segmento A7 en los machos.

El mecanismo por el que esto sería posible no está claro. Una posible explicación podría ser la regulación de la expresión de *wg* (y quizás otros genes). Para la supresión del A7 se requiere la represión de *wg*, ya que al forzar la expresión de *wg* en este segmento se produce un pequeño A7 (Wang et al., 2011; Foronda et al., 2012; Sing and Mishra, 2014).

Hemos encontrado que *hth* se requiere para su represión de manera independiente a *Abd-B*, y que por tanto *Abd-B* y *DsxM* son incapaces de reprimir la expresión de *wg* en ausencia de *hth* o *exd*. La represión de *wg* ya es patente a las 20 h. DFP, cuando la expresión de *hth* comienza a ser dimórfica, por lo que para este proceso no se requiere el incremento en los niveles de *hth* y *exd* en este segmento propio de pupas macho más avanzadas. En etapas más tardías, entre las 22 y las 26 h. DFP, durante las cuales el A7 desaparece, las diferencias de expresión de *hth* entre machos y hembras son más patentes, y podrían estar regulando de manera dimórfica otros genes implicados en el proceso.

La complejidad de la regulación del desarrollo del segmento A7 por *hth* y *exd*, y su interacción con *Abd-B*, pueden ser responsables de algunos fenotipos que son difíciles de explicar. Así, en nuestros experimentos en machos solo aparece un segmento A7 cuando se realiza el silenciamiento con *761-Gal4*, pero no con *pnr-Gal4*, y tampoco lo hemos encontrado en clones mutantes para *hth*. Estos clones, en el abdomen, son de pequeño tamaño, por lo que el efecto de reducir *hth* en todo el segmento podría deberse a la regulación de algún factor no autónomo celular: los clones no eliminarían la expresión de todo el dominio de este gen y el efecto de su ausencia en los mismos podría ser rescatado por las células circundantes, mientras que tal rescate no podría ocurrir en las combinaciones genéticas que eliminasen toda la expresión del gen.

5.2.4 Regulación de genes diana de *Abd-B* en el A7

Para esclarecer las relaciones entre *Abd-B* y *hth/exd*, decidimos estudiar su efecto sobre dos genes regulados por *Abd-B*. Así, si el requerimiento de Hth y Exd se debe a su unión como cofactor de *Abd-B*, su efecto será dependiente de la presencia de *Abd-B*, mientras que si actúan en paralelo e independientemente de *Abd-B*, su efecto no dependerá de la presencia de esta proteína.

Hemos estudiado el efecto de Hth y Exd en la regulación del gen *wg* (Wang et al., 2012) y *bab* (Couderc et al., 2002) en el abdomen posterior. *Abd-B* y *DsxM* regulan negativamente a *wg*, con el resultado de que su expresión se encuentra reprimida en el A7 de machos (Wang et al., 2011). Cuando silenciamos *hth* o *exd* con la línea *761-Gal4*, se recupera la expresión de *Wg* en este segmento. Esto se puede deber, bien a que *Abd-B* requiera como cofactores a *Exd* y *Hth* para reprimir a *wg* o bien a que éstos se requieran de forma independiente. Existe un precedente de regulación de *wg* por Hth de forma independiente a las proteínas Hox. En el “pouch” del disco imaginal de ala, un territorio en el que no hay expresión de genes Hox, la expresión ectópica de *hth* es capaz de reprimir a *wg* (Azpiazu y Morata, 2000). Para comprobar si esta regulación era la que se estaba dando en el A7 de los machos, decidimos estudiar el efecto de *hth* en un fondo mutante para *Abd-B*. En la combinación *UAS GFP/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*, *wg* se expresa en el A7, como cabría esperar ya que se produce una transformación hacia A6. Sin embargo, la sobreexpresión de Hth sobre ese fondo genético (*UAS hth/+; 761-Gal4 UAS-GFP/Abd-B^{M1}*) reprime

completamente a *wg*, a pesar de producirse una transformación a A6, evidenciada por la presencia de un segmento extra con las características de aquél. Este resultado sugiere que la represión de *wg* por Hth ocurre de forma independiente a *Abd-B*.

De forma similar a lo que ocurre con *wg*, *bab* se encuentra reprimido por Abd-B y DsxM en los machos, pero en este caso se encuentra activado en las hembras por DsxF (Kopp et al., 2000; Williams et al., 2008). Se conoce que *hth* es un regulador positivo de la región activadora de *bab1* dimórfica (que regula la expresión de *bab* en la región posterior), habiéndose observado que su silenciamiento produce una pérdida de la expresión de una construcción indicadora en el A6 de hembras (Rogers et al., 2014). De forma similar, en nuestros experimentos hemos encontrado que el silenciamiento de *exd* produce una bajada de la expresión de Bab1 en todo el abdomen, tanto en machos como en hembras. Esto indica que la en los machos es opuesta con respecto a *Abd-B*: mientras que Abd-B reprime a *bab*, *exd* se requiere para su expresión

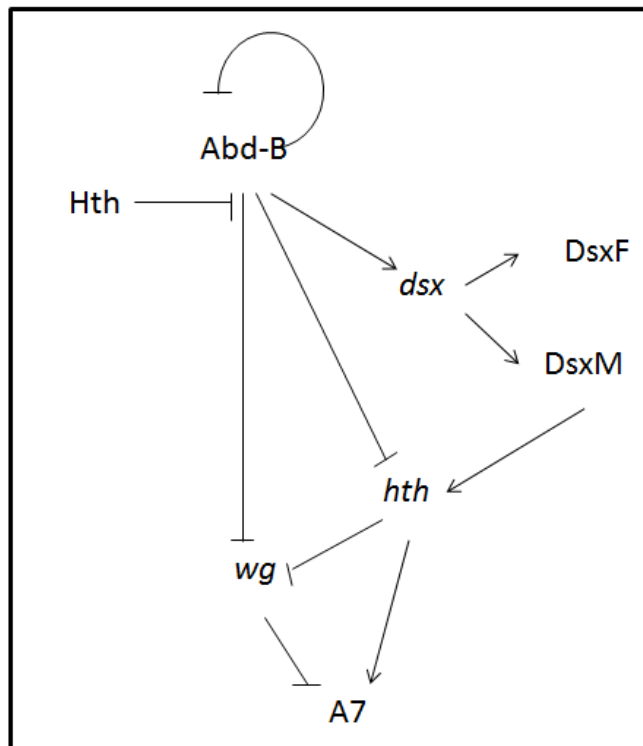


Fig. D1. Regulación de la formación del A7 en machos. Hth regula negativamente la actividad de Abd-B (en ambos sexos), y Abd-B regula su expresión de manera negativa. *Abd-B* activa a *dsx* (Wang y Yoder, 2012), y su isoforma DsxM activa la expresión de *hth*, contrarrestando la represión de *Abd-B* sobre *hth* en etapas tardías (22-26 h. DFP), que se manifiesta en las hembras. *hth* colabora en la represión de *wg*, de manera independiente de *Abd-B*, pero a su vez se requiere para el crecimiento o viabilidad, también de manera independiente a *Abd-B*.

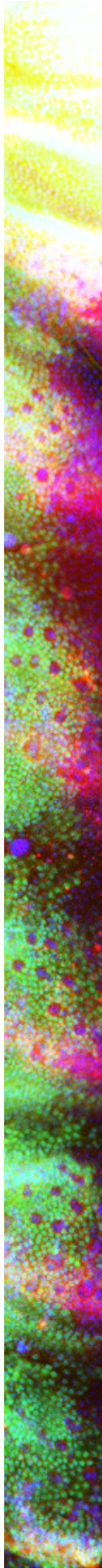
5.2.5 Función de Exd y Hth en el desarrollo del A8 (Genitalia femenina)

Abd-B especifica tanto las placas genitales como la modificación de las quetas en dientes vaginales (D. Foronda y E. Sánchez-Herrero, comunicación personal). La pérdida de *hth* (Estrada et al, 2001), o el silenciamiento de *hth* o de *exd* aumentan el número de dientes vaginales a la vez que provocan una pérdida de su alineamiento. Sin embargo, la región competente para dar lugar a dientes vaginales sigue siendo los bordes de la abertura vaginal. La sobreexpresión de *hth* produce la pérdida de los dientes vaginales y las placas vagi-

nales y la transformación en esternito, un efecto similar al de la pérdida de *Abd-B*. Estos resultados sugieren que *Abd-B* es capaz de especificar las placas genitales y los dientes vaginales en solitario, sin *hth* o *exd*, y que la sobreexpresión de *hth* es capaz de impedir su actividad. Nuevamente, estamos ante el modelo en que *Exd* y *Hth* inhiben la función de *Abd-B* (Sambrani et al, 2013; Rivas et al, 2013). Cuando se reducen los niveles de *exd* sobre un fondo mutante de *Abd-B*, se obtiene un rescate parcial del fenotipo mutante. Suponiendo que los niveles de *Abd-B* no cambiasen en este experimento, esto sugiere que al menos parte del fenotipo mutante *Abd-B* se debe a la actividad de *Exd*, o que la poca proteína *Abd-B* que queda en el fenotipo mutante aumenta su actividad y es capaz de formar parte de la genitalia (pero los dientes se transforman en quetas, luego la actividad debe ser reducida). Para validar uno u otro modelo se debería determinar si cambia la expresión de *Abd-B* en ausencia de *hth* o de *exd*.

5.2.6 Requerimiento mutuo de *Exd* y *Hth*

El modelo clásico del requerimiento mutuo de *exd* y *hth* propone que *Hth* se requiere para internalizar a *Exd* en el núcleo, y que en ausencia de *hth*, *Exd* permanece en el citoplasma inactivo (Mann y Abu-Shaar, 1996; Aspland y White, 1997; Rieckhof et al., 1997; Kurant et al., 1998; Pai et al., 1998). De forma recíproca, la ausencia de *Exd* hace que *Hth* se degrade (Ryoo et al., 1999). Este requerimiento mutuo ha llevado a que se les considere una unidad funcional, al menos en lo que respecta a la isoforma mayor de *Hth* (Corsetti et al., 2013). Recientemente se ha publicado que *Hth* es capaz de activar transcripcionalmente a *exd* (Corsetti et al., 2013). En nuestros resultados, hemos encontrado que al silenciar *hth* no cambia la localización de *Exd* al citoplasma, sino que tiene lugar una disminución muy fuerte de su expresión, confirmando los experimentos de expresión ectópica (Corsetti et al., 2013). Sin embargo, diferentes resultados publicados anteriormente indican que este cambio del citoplasma al núcleo, y no la disminución de la expresión, se debe a la actividad de *Hth*, por lo que no sabemos a qué se debe el comportamiento anómalo en los histoblastos pupales.



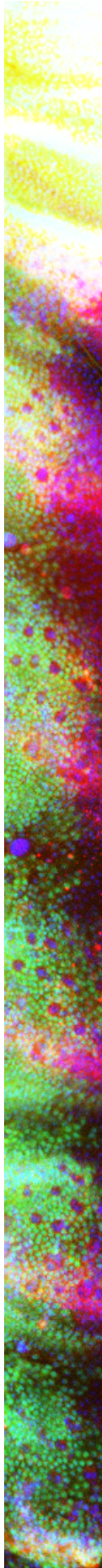
Conclusiones

6. Conclusiones

- 1) La proteína Abd-B contiene varios motivos conservados que regulan su especificidad y actividad: mutaciones en los mismos afectan de manera distinta a la formación de diferentes caracteres que solo la proteína Abdominal-B puede controlar (desarrollo de espiráculos posteriores, represión del segmento séptimo abdominal de los machos, formación de la genitalia de la hembra), y a la represión de la transcripción del inserto *vestigial Quadrant*.
- 2) Los motivos de la proteína en el “linker”, Hexapéptido, brazo N-terminal del homeodominio y dominio C-terminal son requeridos para el desarrollo específico de uno o más de estos caracteres. La mutación en un aminoácido del homeodominio requerido para la unión al DNA hace que la proteína no sea funcional, pero la mutación de éste y dos aminoácidos que también se unen al DNA permite que la proteína regule la expresión de *vestigial Quadrant* de forma similar a la proteína silvestre.
- 3) Abdominal-B interacciona con Extradenticle en presencia de Homothorax a través del Triptófano del Hexapéptido en experimentos *in vitro*. La mutación de este aminoácido da lugar a una proteína Abdominal-B que funciona mejor que la nativa en experimentos de rescate de dos fenotipos mutantes.
- 4) Hth y Exd se requieren de manera sexualmente dimórfica en la morfogénesis del segmento séptimo abdominal. En los machos se requieren para impedir el desarrollo del segmento, mientras que en las hembras evitan su reducción.
- 5) *Abdominal-B* reprime a *homothorax* en el segmento séptimo abdominal de las hembras y Doublesex Male aumenta los niveles de *homothorax* en los histoblastos del segmento séptimo abdominal de los machos antes de que éstos se invaginen.
- 6) Los niveles de expresión de *Abdominal-B* son mayores en los histoblastos del segmento séptimo abdominal de machos que en los de hembras.
- 7) *extradenticle* y *homothorax* suprimen la formación de dientes vaginales, posiblemente en parte mediante la unión a *Abdominal-B* a través del triptófano del Hexapéptido, y su sobreexpresión reduce la actividad de *Abdominal-B*.

112 CONCLUSIONES

- 8) *homothorax* regula la expresión de *extradenticle*, *Abdominal-B*, *abdominal-A* y *bric-à-brac* en los histoblastos de pupa.
- 9) *homothorax* y *extradenticle* se requieren para la represión de *wingless* en el segmento séptimo abdominal de machos de manera independiente a *Abdominal-B*.



Referencias

7. Referencias

- Abe N, Dror I, Yang L, Slattery M, Zhou T, Bussemaker HJ, Rohs R, Mann RS** (2015). *Deconvolving the recognition of DNA shape from sequence*. Cell, Apr 9;161(2):307-18.
- Abu-Shaar M, Ryoo HD, Mann RS** (1999). *Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals*. Genes Dev. Apr 15;13(8):935-45.
- Akam M** (1987). *The molecular basis for metameric pattern in the Drosophila embryo*. Development, Sep;101(1):1-22.
- Akbari OS, Bousum A, Bae E, Drewell RA** (2006). *Unraveling cis-regulatory mechanisms at the abdominal-A and Abdominal-B genes in the Drosophila bithorax complex*. Dev Biol, May 15;293(2):294-304.
- Angelini DR, Kaufman TC** (2005). *Comparative developmental genetics and the evolution of arthropod body plans*. Annu Rev Genet., 39:95-119.
- Arbeitman MN, Kopp A, Siegal ML, Van Doren M.** (2010). *Everything you always wanted to know about sex ... in flies*. Sex Dev, 4(6):315-20.
- Aspland SE, White RA** (1997). *Nucleocytoplasmic localisation of extradenticle protein is spatially regulated throughout development in Drosophila*. Development, Feb;124(3):741-7.
- Azpiaz N, Morata G** (2000). *Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of Drosophila*. Development, Jun;127(12):2685-93.
- Azpiaz N, Morata G** (1998). *Functional and regulatory interactions between Hox and extradenticle genes*. Genes Dev, Jan 15;12(2):261-73.
- Bantignies F, Roure V, Comet I, Leblanc B, Schuettengruber B, Bonnet J, Tixier V, Mas A, Cavalli** (2011). *Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in Drosophila*. G.Cell, Jan 21;144(2):214-26.
- Bateson W** (1894). *Materials for the study of variation: treated with especial regard to discontinuity in the origin of species*.
- Biggin MD, McGinnis W** (1997). *Regulation of segmentation and segmental identity by Drosophila homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity*. Development, Nov;124(22):4425-33.
- Billeter JC, Rideout EJ, Dornan AJ, Goodwin SF** (2006). *Control of male sexual behavior in Drosophila by the sex determination pathway*. Curr Biol, Sep 5;16(17):R766-76.

Boulet AM, Lloyd A, Sakonju S (1991). *Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the cis-regulatory elements of the Drosophila Abd-B homeotic gene*. Development, Feb;111(2):393-405.

Brand AH, Perrimon N (1993). *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, Jun;118(2):401-15.

Brand AH, Manoukian AS, Perrimon N (1994). *Ectopic expression in Drosophila*. Methods Cell Biol, 44:635-54.

Casanova J, Sánchez-Herrero E, Morata G (1986). *Identification and characterization of a parasegment specific regulatory element of the abdominal-B gene of Drosophila*. Cell, Nov 21;47(4):627-36.

Casares F, Calleja M, Sánchez-Herrero E (1996). *Functional similarity in appendage specification by the Ultrabithorax and abdominal-A Drosophila HOX genes*. EMBO J., Aug 1;15 (15):3934-42.

Casares F, Bender W, Merriam J, Sánchez-Herrero E (1997). *Interactions of Drosophila Ultrabithorax regulatory regions with native and foreign promoters*. Genetics, Jan;145(1):123-37.

Casares F, Mann RS (1998). *Control of antennal versus leg development in Drosophila*. Nature, Apr 16;392(6677):723-6.

Castelli-Gair J, Greig S, Micklem G, Akam M (1994). *Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function*. Development, Jul;120(7):1983-95.

Celniker SE, Keelan DJ, Lewis EB (1989). *The molecular genetics of the bithorax complex of Drosophila: characterization of the products of the Abdominal-B domain*. Genes Dev, Sep;3 (9):1424-36.

Celniker SE, Sharma S, Keelan DJ, Lewis EB (1990). *The molecular genetics of the bithorax complex of Drosophila: cis-regulation in the Abdominal-B domain*. EMBO J., Dec;9(13):4277-86.

Chan SK, Jaffe L, Capovilla M, Botas J, Mann RS (1994). *The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeo-protein*. Cell, Aug 26;78(4):603-15.

Chan SK, Mann RS (1996). *A structural model for a homeotic protein-extradenticle-DNA complex accounts for the choice of HOX protein in the heterodimer*. Proc Natl Acad Sci U S A, May 28;93(11):5223-8.

Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C, Cleary ML (1996). *Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus*. Mol Cell Biol, Apr;16(4):1734-45.

- Chauvet S, Merabet S, Bilder D, Scott MP, Pradel J, Graba Y** (2000). *Distinct hox protein sequences determine specificity in different tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A., Apr 11;97(8):4064-9.
- Choo SW, White R, Russell S** (2011). *Genome-wide analysis of the binding of the Hox protein Ultrabithorax and the Hox cofactor Homothorax in Drosophila*. PLoS One, Apr 5;6(4):e14778.
- Christiansen AE, Keisman EL, Ahmad SM, Baker BS.** (2002) *Sex comes in from the cold: the integration of sex and pattern*. Trends Genet, Oct;18(10):510-6.
- Cohen B, Wimmer EA, Cohen SM** (1991). *Early development of leg and wing primordia in the Drosophila embryo*. Mech Dev, Mar;33(3):229-40.
- Cohen B, Simcox AA, Cohen SM** (1993). *Allocation of the thoracic imaginal primordia in the Drosophila embryo*. Development, Feb;117(2):597-608.
- Corsetti E, Azpiazu N** (2013). *Functional dissection of the splice variants of the Drosophila gene homothorax (hth)*. Dev Biol, Dec 1;384(1):72-82.
- Couderc JL, Godt D, Zollman S, Chen J, Li M, Tiong S, Cramton SE, Sahut-Barnola I, Laski FA** (2002). *The bric à brac locus consists of two paralogous genes encoding BTB/POZ domain proteins and acts as a homeotic and morphogenetic regulator of imaginal development in Drosophila*. Development, May;129(10):2419-33.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ** (2007). *A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila*. Nature, Jul 12;448(7150):151-6.
- Duboule D, Morata G** (1994). *Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes*. Trends Genet, Oct;10(10):358-64.
- Eaton S, Kornberg TB** (1990). *Repression of ci-D in posterior compartments of Drosophila by engrailed*. Genes Dev., Jun;4(6):1068-77
- Ebner A, Cabernard C, Affolter M, Merabet S** (2005). *Recognition of distinct target sites by a unique Labial/Extradenticle/Homothorax complex*. Development, Apr;132(7):1591-600.
- Ekker SC, Jackson DG, von Kessler DP, Sun BI, Young KE, Beachy PA** (1994). *The degree of variation in DNA sequence recognition among four Drosophila homeotic proteins*. EMBO J, Aug 1;13(15):3551-60.
- Epper S.** (1983). *Three dimensional fate map of the female genital disc of Drosophila melanogaster*. Roux' Arch. Dev. Biol. 192, 270-274.
- Estrada B, Casares F, Sánchez-Herrero E** (2003). *Development of the genitalia in Drosophila melanogaster*. Differentiation, Aug;71(6):299-310.
- Foronda D, Martín P, Sánchez-Herrero E** (2012). *Drosophila Hox and sex-determination ge-*

nes control segment elimination through EGFR and extramacrochetæ activity. PLoS Genet, 8(8):e1002874.

Freeland DE, Kuhn DT (1996). *Expression patterns of developmental genes reveal segment and parasegment organization of D. melanogaster genital discs. Mech Dev, May; 56(1-2):61-72.*

Frohnhofer HG, Lehmann R, Nüsslein-Volhard (1986). *Manipulating the anteroposterior pattern of the Drosophila embryo. J Embryol Exp Morphol, Oct; 97 Suppl:169-79.*

Galant R, Walsh CM, Carroll SB (2007). *Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. Development, Jul;129(13):3115-26.*

Garcia-Bellido A, Santamaria P. Genetics (1972). *Developmental analysis of the wing disc in the mutant engrailed of Drosophila melanogaster, Sep;72(1):87-104.*

Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G. Developmental (1973). *Compartmentalisation of the wing disk of Drosophila. Nat New Biol, Oct 24;245(147):251-3.*

Garcia-Bellido A, Merriam JR (1971). *Clonal parameters of tergite development in Drosophila. Dev Biol, Oct;26(2):264-76.*

Gavis ER, Hogness DS (1991). *Phosphorylation, expression and function of the Ultrabithorax protein family in Drosophila melanogaster. Development, Aug;112(4):1077-93.*

Gebelein B, Culi J, Ryoo HD, Zhang W, Mann RS (2002). *Specificity of Distalless repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins. Dev Cell, Oct;3(4):487-98.*

Gebelein B, McKay DJ, Mann RS (2004). *Direct integration of Hox and segmentation gene inputs during Drosophila development. Nature, Oct 7;431(7009):653-9.*

González-Crespo S, Morata G (1995). *Control of Drosophila adult pattern by extradenticle. Development, Jul;121(7):2117-25.*

González-Reyes A, Morata G (1990). *The developmental effect of overexpressing a Ubx product in Drosophila embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. Cell, May 4;61(3):515-22.*

González-Reyes A, Urquía N, Gehring WJ, Struhl G, Morata G. Nature (1990). *Are cross-regulatory interactions between homoeotic genes functionally significant? Nature, Mar 1;344(6261):78-80.*

Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004). *Construction of transgenic Drosophila by using the site-specific integrase from phage phiC31. Genetics, Apr;166(4):1775-82.*

Guerra M, Postlethwait JH, Schneiderman HA (1973). *The development of the imaginal abdomen of Drosophila melanogaster. Dev Biol, Jun;32(2):361-72.*

- Gyurkovics H, Gausz J, Kummer J, Karch F** (1990). *A new homeotic mutation in the Drosophila bithorax complex removes a boundary separating two domains of regulation*. EMBO J, Aug;9(8):2579-85.
- Hafen E, Levine M, Gehring WJ.** (1984). *Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in Drosophila*. Nature, Jan 19-25;307(5948):287-9.
- Hertweck, H** (1931). *Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von Drosophila melanogaster (Meigen)*. Z. Wiss. Zool. 139,559-663.
- Hidalgo A, Ingham P** (1990). *Cell patterning in the Drosophila segment: spatial regulation of the segment polarity gene patched*. Development, Sep;110(1):291-301.
- Hopmann R, Duncan D, Duncan I** (1995). *Transvection in the iab-5,6,7 region of the bithorax complex of Drosophila: homology independent interactions in trans*. Genetics, Feb;139(2):815-33.
- Hueber SD, Bezdan D, Henz SR, Blank M, Wu H, Lohmann I** (2006). *Comparative analysis of Hox downstream genes in Drosophila*. Development, Jan;134(2):381-92.
- Hudry B, Remacle S, Delfini MC, Rezsohazy R, Graba Y, Merabet S.** (2012). *Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the PBC class cofactors*. PLoS Biol., 10(6):e1001351.
- Hudry B, Viala S, Graba Y, Merabet S** (2011). *Visualization of protein interactions in living Drosophila embryos by the bimolecular fluorescence complementation assay*. BMC Biol., Jan 28;9:5.
- Ingham PW** (1988). *The molecular genetics of embryonic pattern formation in Drosophila Abdominal gene organization*. Nature. 1988 Sep 1;335(6185):25-34. Erratum in: Nature, Oct 20;335(6192):744.
- Jacobs Y, Schnabel CA, Cleary ML** (1999). *Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity*. Mol Cell Biol., Jul;19(7):5134-42.
- Jaffe L, Ryoo HD, Mann RS** (1997). *A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating Antennapedia activity in Drosophila*. Genes Dev., May 15;11(10):1327-40.
- Johnson RL, Riddle RD, Tabin CJ** (1994). *Mechanisms of limb patterning*. Curr Opin Genet Dev., Aug;4(4):535-42
- Johnson FB, Parker E, Krasnow MA** (1995). *Extradenticle protein is a selective cofactor for the Drosophila homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jan 31;92(3):739-43.
- Joshi R, Passner JM, Rohs R, Jain R, Sosinsky A, Crickmore MA, Jacob V, Aggarwal AK, Honig B, Mann RS** (2007). *Functional specificity of a Hox protein mediated by the recogni-*

tion of minor groove structure. Cell, Nov 2;131(3):530-43.

Karch F, Weiffenbach B, Peifer M, Bender W, Duncan I, Celniker S, Crosby M, Lewis EB (1985). *The abdominal region of the bithorax complex. Cell, Nov;43(1):81-96.*

Karr TL, Ali Z, Drees B, Kornberg T (1985). *The engrailed locus of D. melanogaster provides an essential zygotic function in precellular embryos. Cell, Dec;43(3 Pt 2):591-601.*

Kaufman TC, Seeger MA, Olsen G (1990). *Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of Drosophila melanogaster. Adv Genet., 27:309-62.*

Keilin MD (1911). *Sur certains organs sensitifs constants chez les larves de Dípteres et leur signification probable. Comtes Rendus, Nov, 20:977-979.*

Keisman EL, Baker BS (2001). *The Drosophila sex determination hierarchy modulates wingless and decapentaplegic signaling to deploy dachshund sex-specifically in the genital imaginal disc. Development, May;128(9):1643-56.*

Keisman EL, Christiansen AE, Baker BS (2001). *The sex determination gene doublesex regulates the A/P organizer to direct sex-specific patterns of growth in the Drosophila genital imaginal disc. Dev Cell., Aug;1(2):215-25.*

Kennison JA (1995). *The Polycomb and trithorax group proteins of Drosophila: trans-regulators of homeotic gene function. Annu Rev Genet., 29:289-303.*

Kerppola TK (2008). *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. Annu Rev Biophys., 37:465-87*

Knoepfler PS, Kamps MP (1995). *The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. Mol Cell Biol., Oct;15(10):5811-9.*

Kondo S, Ueda R (2013). *Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in Drosophila. Genetics, Nov;195(3):715-21.*

Kopp A, Muskavitch MA, Duncan I (1997). *The roles of hedgehog and engrailed in patterning adult abdominal segments of Drosophila. Development., Oct;124(19):3703-14.*

Kopp A, Duncan I (1997). *Control of cell fate and polarity in the adult abdominal segments of Drosophila by optomotor-blind. Development, Oct;124(19):3715-26.*

Kopp A, Blackman RK, Duncan I (1999). *Wingless, decapentaplegic and EGF receptor signaling pathways interact to specify dorso-ventral pattern in the adult abdomen of Drosophila. Development, Aug;126(16):3495-507.*

Kopp A, Duncan I, Godt D, Carroll SB (2000). *Genetic control and evolution of sexually dimorphic characters in Drosophila. Nature, Nov 30;408(6812):553-9. Erratum in: Nature 2001 Mar*

- Kopp A, Duncan I** (2002) *Anteroposterior patterning in adult abdominal segments of Drosophila*. Dev Biol., Feb 1;242(1):15-30.
- Kurant E, Pai CY, Sharf R, Halachmi N, Sun YH, Salzberg A** (1998). *Dorsotonals/homothorax, the Drosophila homologue of meis1, interacts with extradenticle in patterning of the embryonic PNS*. Development, Mar;125(6):1037-48.
- Kuziora MA** (1993). *Abdominal-B protein isoforms exhibit distinct cuticular transformations and regulatory activities when ectopically expressed in Drosophila embryos*. Mech Dev., Aug;42(3):125-37.
- Kuziora MA, McGinnis W** (1989). *A homeodomain substitution changes the regulatory specificity of the deformed protein in Drosophila embryos*. Cell, Nov 3;59(3):563-71.
- Lamka ML, Boulet AM, Sakonju S** (1992). *Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during Drosophila embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression*. Development, Dec;116(4):841-54.
- Lai SL, Lee T** (2006) *Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in Drosophila*. Nat Neurosci., May;9(5):703-9.
- LaRonde-LeBlanc NA, Wolberger C** (2003). *Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior*. Genes Dev., Aug 15;17(16):2060-72.
- Lawrence PA, Morata G** (1976). *Compartments in the wing of Drosophila: a study of the engrailed gene*. Dev Biol., Jun;50(2):321-37.
- Lelli KM, Noro B, Mann RS** (2011). *Variable motif utilization in homeotic selector (Hox)-cofactor complex formation controls specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, Dec 27;108(52):21122-7.
- Lewis EB** (1978). *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. Nature, Dec 7;276(5688):565-70.
- Lin L, McGinnis W** (1992). *Mapping functional specificity in the Dfd and Ubx homeo domains*. Genes Dev., Jun;6(6):1071-81.
- Lohs-Schardin M, Sander K, Cremer C, Cremer T, Zorn C** (1979). *Localized ultraviolet laser microbeam irradiation of early Drosophila embryos: fate maps based on location and frequency of adult defects*. Dev Biol., Feb;68(2):533-45.
- Lours C, Bardot O, Godt D, Laski FA, Couderc JL** (2003). *The Drosophila melanogaster BTB proteins bric à brac bind DNA through a composite DNA binding domain containing a pipsqueak and an AT-Hook motif*. Nucleic Acids Res., Sep 15;31(18):5389-98.
- Lu Q, Kamps MP** (1996). *Structural determinants within Pbx1 that mediate cooperative DNA binding with pentapeptide-containing Hox proteins: proposal for a model of a Pbx1-*

Hox-DNA complex. Mol Cell Biol., Apr;16(4):1632-40.

Lu Q, Knoepfler PS, Scheele J, Wright DD, Kamps MP (1995). *Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes*. Mol Cell Biol., Jul;15(7):3786-95.

Maconochie MK, Nonchev S, Studer M, Chan SK, Pöpperl H, Sham MH, Mann RS, Krumlauf R (1997). *Cross-regulation in the mouse HoxB complex: the expression of Hoxb2 in rhombomere 4 is regulated by Hoxb1*. Genes Dev., Jul 15;11(14):1885-95.

Maeda RK, Karch F (2006). *The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained*. Development, Apr;133(8):1413-22.

Madhavan MM, Madhavan K. (1980). *Morphogenesis of the epidermis of adult abdomen of Drosophila*. J Embryol Exp Morphol., Dec;60:1-31.

Mann RS, Hogness DS (1990). *Functional dissection of Ultrabithorax proteins in D. melanogaster*. Cell, Feb 23;60(4):597-610.

Mann RS, Chan SK (1996). *Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins*. Trends Genet. 1996 Jul;12(7):258-62. Erratum in: Trends Genet., Aug;12(8):328.

Mann RS, Abu-Shaar M (1996). *Nuclear import of the homeodomain protein extradenticle in response to Wg and Dpp signalling*. Nature, Oct 17;383(6601):630-3.

Mann RS, Lelli KM, Joshi R. (2009). *Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators*. Curr Top Dev Biol., 88:63-101.

Manoli DS, Meissner GW, Baker BS (2006). *Blueprints for behavior: genetic specification of neural circuitry for innate behaviors*. Trends Neurosci., Aug;29(8):444-51.

Martinez-Arias A, Lawrence PA (1985). *Parasegments and compartments in the Drosophila embryo*. Nature, Feb 21-27;313(6004):639-42.

Merabet S, Hudry B, Saadaoui M, Graba Y (2009). *Classification of sequence signatures: a guide to Hox protein function*. Bioessays, May;31(5):500-11.

Merabet S, Saadaoui M, Sambrani N, Hudry B, Pradel J, Affolter M, Graba Y (2007). *A unique Extradenticle recruitment mode in the Drosophila Hox protein Ultrabithorax*. Proc Natl Acad Sci U S A., Oct 23;104(43):16946-51.

Modolell J, Campuzano S (1998). *The achaete-scute complex as an integrating device*. Int J Dev Biol., 42(3):275-82.

Neuteboom ST, Peltenburg LT, van Dijk MA, Murre C (1995). *The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A., Sep 26;92(20):9166-70.

- Ninov N, Chiarelli DA, Martín-Blanco E** (2006). *Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during Drosophila metamorphosis*. Development, Jan;134 (2):367-79.
- Ninov N, Manjón C, Martín-Blanco E.** (2009). *Dynamic control of cell cycle and growth coupling by ecdysone, EGFR, and PI3K signaling in Drosophila histoblasts*. PLoS Biol., Apr 7;7 (4):e1000079.
- Noro B, Lelli K, Sun L, Mann RS** (2011). *Competition for cofactor-dependent DNA binding underlies Hox phenotypic suppression*. Genes Dev., Nov 15;25(22):2327-32.
- Nothiger R, Dubendorfer A, Epper F** (1977). *Gynandromorphs reveal two separate primordia for male and female genitalia in Drosophila melanogaster*. Wilhem Roux's Archives 181, 367-373
- Noyes MB, Christensen RG, Wakabayashi A, Stormo GD, Brodsky MH, Wolfe SA** (2008). *Analysis of homeodomain specificities allows the family-wide prediction of preferred recognition sites*. Cell, Jun 27;133(7):1277-89.
- Nüsslein-Volhard C, Frohnhofer HG, Lehmann R** (1987). *Determination of anteroposterior polarity in Drosophila*. Science, Dec 18;238(4834):1675-81.
- Pai CY, Kuo TS, Jaw TJ, Kurant E, Chen CT, Bessarab DA, Salzberg A, Sun YH** (1998). *The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in Drosophila*. Genes Dev., Feb 1;12(3):435-46.
- Passner JM, Ryoo HD, Shen L, Mann RS, Aggarwal AK** (1999). *Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex*. Nature, Feb 25;397(6721):714-9.
- Peifer M, Wieschaus E** (1990). *Mutations in the Drosophila gene extradenticle affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity*. Genes Dev., Jul;4(7):1209-23.
- Phelan ML, Featherstone MS** (1997). *Distinct HOX N-terminal arm residues are responsible for specificity of DNA recognition by HOX monomers and HOX.PBX heterodimers*. J Biol Chem., Mar 28;272(13):8635-43.
- Piper DE, Batchelor AH, Chang CP, Cleary ML, Wolberger C** (1999). *Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation*. Cell., Feb 19;96(4):587-97.
- Pirrotta V, Chan CS, McCabe D, Qian S.** (1995). *Distinct parasegmental and imaginal enhancers and the establishment of the expression pattern of the Ubx gene*. Genetics, Dec;141(4):1439-50.
- Potter CJ, Tasic B, Russler EV, Liang L, Luo L** (2010). *The Q system: a repressible binary sys-*

tem for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. Cell, Apr 30;141(3):536-48.

Rauskolb C, Peifer M, Wieschaus E. (1993). *extradenticle, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene pbx1.* Cell, Sep 24;74(6):1101-12.

Rauskolb C, Smith KM, Peifer M, Wieschaus E (1995). *extradenticle determines segmental identities throughout Drosophila development.* Development, Nov;121(11):3663-73.

Rezsohazy R, Saurin AJ, Maurel-Zaffran C, Graba Y (2015). *Cellular and molecular insights into Hox protein action.* Development, Apr 1;142(7):1212-1227.

Rieckhof GE, Casares F, Ryoo HD, Abu-Shaar M, Mann RS (1997). *Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein.* Cell, Oct 17;91(2):171-83.

Rincón-Limas DE1, Lu CH, Canal I, Calleja M, Rodríguez-Esteban C, Izpisúa-Belmonte JC, Botas J (1999). *Conservation of the expression and function of apterous orthologs in Drosophila and mammals.* Proc Natl Acad Sci U S A., Mar 2;96(5):2165-70.

Rivas ML, Espinosa-Vázquez JM, Sambrani N, Greig S, Merabet S, Graba Y, Hombría JC (2013). *Antagonism versus cooperativity with TALE cofactors at the base of the functional diversification of Hox protein function.* PLoS Genet., 9(2):e1003252.

Robertson LK, Bowling DB, Mahaffey JP, Imiolczyk B, Mahaffey JW. (2004). *An interactive network of zinc-finger proteins contributes to regionalization of the Drosophila embryo and establishes the domains of HOM-C protein function.* Development, Jun;131(12):2781-9.

Robinett CC, Vaughan AG, Knapp JM, Baker BS (2010). *Sex and the single cell. II. There is a time and place for sex.* PLoS Biol., May 4;8(5):e1000365.

Rogers WA, Grover S, Stringer SJ, Parks J, Rebeiz M, Williams TM (2014). *A survey of the trans-regulatory landscape for Drosophila melanogaster abdominal pigmentation.* Dev Biol., Jan 15;385(2):417-32.

Ryoo HD, Marty T, Casares F, Affolter M, Mann RS (1999). *Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex.* Development, Nov;126(22):5137-48.

Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G (2007). *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins.* Cell, Feb 23;128(4):735-45.

Schierwater B, Kamm K (2010). *The early evolution of Hox genes: a battle of belief?* Adv Exp Med Biol., 689:81-90.

Saadaoui M, Merabet S, Litim-Mecheri I, Arbeille E, Sambrani N, Damen W, Brena C, Pradel J, Graba Y. (2011). *Selection of distinct Hox-Extradenticle interaction modes fine-tunes*

Hox protein activity. Proc Natl Acad Sci U S A., Feb 8;108(6):2276-81.

Salvany L, Aldaz S, Corsetti E, Azpiazu N (2009). *A new role for hth in the early pre-blastodermic divisions in drosophila*. Cell Cycle, Sep 1;8(17):2748-55.

Sambrani N, Hudry B, Maurel-Zaffran C, Zouaz A, Mishra R, Merabet S, Graba Y (2013). *Distinct molecular strategies for Hox-mediated limb suppression in Drosophila: from cooperativity to dispensability/antagonism in TALE partnership*. PLoS Genet., 9(2):e1003252.

Sánchez-Herrero E, Vernós I, Marco R, Morata G (1985). *Genetic organization of Drosophila bithorax complex*. Nature, Jan 10-18;313(5998):108-13.

Sánchez-Herrero E (1991). *Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in Drosophila embryos*. Development, Feb;111(2):437-49.

Sánchez L, Gorfinkiel N, Guerrero I (2001). *Sex determination genes control the development of the Drosophila genital disc, modulating the response to Hedgehog, Wingless and Decapentaplegic signals*. Development, Apr;128(7):1033-43.

Sánchez L, Guerrero I (2001). *The development of the Drosophila genital disc*. Bioessays, Aug;23(8):698-707.

Shanmugam K, Featherstone MS, Saragovi HU (1997). *Residues flanking the HOX YPWM motif contribute to cooperative interactions with PBX*. J Biol Chem., Jul 25;272(30):19081-7.

Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, Largman C (1997). *AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins*. Mol Cell Biol., Nov;17(11):6448-58.

Shirras AD, Couso JP (1996). *Cell fates in the adult abdomen of Drosophila are determined by wingless during pupal development*. Dev Biol., Apr 10;175(1):24-36.

Singh NP, Mishra RK (2014). *Role of abd-A and Abd-B in development of abdominal epithelia breaks posterior prevalence rule*. PLoS Genet., Oct 23;10(10):e1004717.

Sivanantharajah L, Percival-Smith A (2014). *Acquisition of a leucine zipper motif as a mechanism of antimorphy for an allele of the Drosophila Hox gene Sex combs reduced*. G3 (Bethesda), Mar 12;4(5):829-38.

Slattery M, Riley T, Liu P, Abe N, Gomez-Alcala P, Dror I, Zhou T, Rohs R, Honig B, Bussemaker HJ, Mann RS (2011). *Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between Hox proteins*. Cell, Dec 9;147(6):1270-82.

Stöbe P, Stein MA, Habring-Müller A, Bezdan D, Fuchs AL, Hueber SD, Wu H, Lohmann I (2009). *Multifactorial regulation of a hox target gene*. PLoS Genet., Mar;5(3):e1000412.

Struhl G, White RA (1985). *Regulation of the Ultrabithorax gene of Drosophila by other bithorax complex genes*. Cell, Dec;43(2 Pt 1):507-19.

Struhl G, Barbash DA, Lawrence PA (1997) *Hedgehog organises the pattern and polarity of epidermal cells in the Drosophila abdomen*. Development, Jun;124(11):2143-54.

Struhl G, Barbash DA, Lawrence PA (1997). *Hedgehog acts by distinct gradient and signal relay mechanisms to organise cell type and cell polarity in the Drosophila abdomen*. Development, Jun;124(11):2155-65.

Tabata T, Schwartz C, Gustavson E, Ali Z, Kornberg TB (1995). *Creating a Drosophila wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis*. Development, Oct;121(10):3359-69.

Taghli-Lamalle O, Gallet A, Leroy F, Malapert P, Vola C, Kerridge S, Fasano L (2007). *Direct interaction between Teashirt and Sex combs reduced proteins, via Tsh's acidic domain, is essential for specifying the identity of the prothorax in Drosophila*. Dev Biol., Jul 1;307(1):142-51.

Tiong S, Bone LM, Whittle JR (1985). *Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in Drosophila*. Mol Gen Genet., 200(2):335-42.

van Dijk MA, Murre C (1994). *extradenticle raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products*. Cell, Aug 26;78(4):617-24.

Wang C, Lehmann R (1991). *Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila*. Cell, Aug 23;66(4):637-47. Erratum in: Cell 1992 Mar 20;68(6):1177.

Wang W, Kidd BJ, Carroll SB, Yoder JH (2011). *Sexually dimorphic regulation of the Wingless morphogen controls sex-specific segment number in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A., Jul 5;108(27):11139-44.

Wang W, Tindell N, Yan S, Yoder JH (2013). *Homeotic functions of the Teashirt transcription factor during adult Drosophila development*. Biol Open, Jan 15;2(1):18-29.

Wang W, Yoder JH (2012). *Hox-mediated regulation of doublesex sculpts sex-specific abdomen morphology in Drosophila*. Dev Dyn., Jun;241(6):1076-90. doi: 10.1002/dvdy.23791.

Williams TM, Selegue JE, Werner T, Gompel N, Kopp A, Carroll SB (2008). *The regulation and evolution of a genetic switch controlling sexually dimorphic traits in Drosophila*. Cell, Aug 22;134(4):610-23.

Wittkopp PJ, Williams BL, Selegue JE, Carroll SB (2003). *Drosophila pigmentation evolution: divergent genotypes underlying convergent phenotypes*. Proc Natl Acad Sci USA., Feb 18;100(4):1808-13.

Xu T, Rubin (1993). *Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues*. GM.Development. Apr;117(4):1223-37.

Yao LC, Liaw GJ, Pai CY, Sun YH (1999). *A common mechanism for antenna-to-Leg transformation in Drosophila: suppression of homothorax transcription by four HOM-C genes*.

Dev Biol., Jul 15;211(2):268-76.

Yeh E, Zhou L, Rudzik N, Boulianne GL (2000). *Neuralized functions cell autonomously to regulate Drosophila sense organ development*. EMBO J., Sep 1;19(17):4827-37.

Zavortink M, Sakonju S (1989). *The morphogenetic and regulatory functions of the Drosophila Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters*. Genes Dev., Dec;3(12A):1969-81

Zecca M, Basler K, Struhl G (1995) *Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing*. Development, Aug;121(8):2265-78.

Zeng W, Andrew DJ, Mathies LD, Horner MA, Scott MP (1993). *Ectopic expression and function of the Antp and Scr homeotic genes: the N terminus of the homeodomain is critical to functional specificity*. Development, Jun;118(2):339-52.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible esta tesis, algunas mediante su ayuda desinteresada, otras por su amistad y apoyo.

A mi tutor Ernesto, que me ha enseñado todo lo que sé de genética en *Drosophila*, y me ha abierto las puertas a la carrera investigadora. Sin él no habrían sido posibles estos años de aprendizaje y de hallazgos científicos, ni tampoco los que vendrán. Son muchas cosas buenas las que me llevo en la mochila para mi próxima etapa.

A mis compañeros del laboratorio, que han sido como hermanos para mí. Ya que trabajamos en común con los grupos de Ginés Morata y Natalia Azpiazu, nombro también a sus equipos. A Foronda, que acompañó mis primeros pasos en la genética de *Drosophila*, y que con su genialidad, hacía del laboratorio un lugar especial. A Ainoa, que lo llenaba todo de alegría, y que cuando se fue dejó un cartel de “hasta pronto”. A Paco, por su personalidad expansiva y por su pasión por la ciencia. A Javi por estar siempre cerca de su tierra y por su humor. A Ievgeni por su empeño en alcanzar sus sueños. A Ana y Dani por su capacidad y su buen rollo, y por todas las cosas que me enseñaron. A Salva, por seguir siempre su camino, y ser un ejemplo en tantas cosas. A Luis, por compartir el amor por nuestra facultad de Biología y las comidas en el césped. A María, por el Yoga y por su visión de la vida. A Rosa, por ser siempre una referencia, con esa personalidad positiva que la caracteriza, y a su hija, por ser como ella. A Angélica, por su alegría y personalidad arrolladora. A Paloma, por su amor por los animales, por tener los stocks más sanos y por ser un apoyo y una consejera en las cosas de la ciencia y de la vida. A Lucía, Miguel, y tantos estudiantes de grado y de máster que han pasado por el laboratorio estos años: siempre me he sentido muy afortunado de compartir el laboratorio con vosotros. A Inés, Delia, Nuria, y Rafa, por su juventud, empuje e ilusión con sus proyectos, dentro y fuera del laboratorio, y por lo que me han ayudado, especialmente Nuria. A Antonio, por su amor por el campo. A David, por su afición por el mar y el buceo. A Luna, por su dedicación y entrega a tantas buenas causas. A Vero, por venir desde tan lejos a estar con nosotros. A Elise, por ser una persona buena, algo tan difícil de encontrar. A Savita, por las excursiones compartidas, por su alegría y personalidad. A Álvaro, por escoger nuestro laboratorio para rescatar su tesis. A Raquel, por su amor por su hija y por su experiencia y ayuda. A Noe, por ser siempre tan cercana. A Carlos, por su curiosidad y aficiones compartidas. A Jesús Romero, por la ayuda que me prestó, y por su dedicación y equilibrio.

A mis compañeros del departamento. A Marta Moris, del laboratorio de F. Benjumea, por ser una persona tan feliz, y por todos los buenos momentos compartidos. A Inma por su energía, personalidad y alegría. A Álvaro Román, Ricardo, Sol, Rocío, Bea, María...

A mis compañeros del máster: David, Pili, Irene, Alejo, Dani, Inés, Miguel, Lucía, Alfonso, Elisa, Lara y alguno más que me debo dejar en el tintero. Todos ellos personas con una enorme capacidad científica y buenos amigos. Gracias por los años que compartimos. También un agradecimiento a compañeros de otros departamentos, como Ana Ortega, y a los servicios de microscopía confocal, informática, mantenimiento, a conserjería, con María Jesús al frente, a lavado y esterilización, a cocina (de comida de moscas) y a Diseño Gráfico. Y una especial mención al servicio de limpieza, con personas como Toñi, que siempre nos alegraban las tardes.

A Ginés Morata y sus colaboradores Manolo Calleja y Natalia Azpiazu, que han sido imprescindibles para realizar esta tesis, tanto por sus comentarios críticos en los seminarios, como por los materiales y recursos que han puesto a mi disposición. También a otros jefes como Ana Busturia, y al resto de jefes del departamento.

A mi laboratorio del IBDML de Marsella, en donde hice varias estancias. A Yacine Graba por acogerme en su grupo y en su casa. A Andrew, por ayudarme con los protocolos. A Samir, por su capacidad y forma de ser, por decir siempre lo que pensaba. A Bruno, por su brillantez, y por su amistad. A Agnes, por todos los momentos compartidos, que fueron muchos, por su pasión por la ciencia y por su generosidad. A Helene, por su dedicación y su ayuda a todos los estudiantes, que fue mucha en mi caso. A Mathieu, por acogerme entre sus amigos. A Corinne, por demostrarme que se podía publicar sin hacer jornadas intensivas en el laboratorio. A Isma, que siempre me echaba un cable. A Amel, por los momentos compartidos, y por su capacidad científica y artística. A Lilian por su español y por su personalidad. A Nagraj, por las futuras publicaciones compartidas.

A la comunidad internacional del IBDML, en donde hay gente increíble trabajando. A Sabrina, por irradiar alegría por los cuatro costados, por acogerme en su casa y honrarme con su amistad generosa. A Diego, por llevar la música de su tierra allí donde va. A la gran Eunice, porque no hay nadie como ella, con su humor, inteligencia y auténtica amistad. A Akanshi, por sus fotos artísticas y su brillantez, a Girish, por su humor, a Ania, por ser como es, y por las excursiones y amistad compartida, A Patricia y Nacho por su amor por la madre naturaleza, ahora desde Ecuador, y por hacer del mundo un lugar más pequeño. A Ahmed, por ser una persona inigualable, y a Vincent, por las comidas compartidas y los consejos.

A los compañeros del laboratorio de Asa Rasmusson, en donde hice mi estancia Erasmus en la licenciatura. A la misma Asa por acogerme en su laboratorio, y por llevarnos a esquiar sobre las costas heladas de Umeå. A Anna, que fue mi mentora dedicada. A Erik, por su amistad, y por su autenticidad. A Sa Chen por su amistad y su amor por sus hijos. A Regina que fue como una madre para mí, y ahora tiene la hija más feliz que pueda haber. A Therese, por su vertiente artística. A Sophia Johansson, que me acogió en el bello Åskersund, y a Annelie Markgreen, que lo hizo en Umeå.

A mis amigos de la licenciatura de Bioquímica: Chema, Diego y Santi. A los amigos de mi etapa en Biología, que es el mejor lugar de toda la Universidad Autónoma. A la doctora Sara Villén, por compartir viajes y aventuras. A Edu por su entusiasmo, iniciativa y activismo. A Mónica por todos los buenos momentos que compartimos y por su compromiso social. A Laura por sus locuras y sus dibujos. A Alberto, por atreverse a volver al campo. A Eva, por sus bailes y su buen rollo. A Maite, a Sara, a Marielo. A toda la gente de la asociación Vivero y Huerto de la UAM: a Junca, Sapi, Manu, Livia, Dhyanna, Lara, Javi, Tere y Jose, Ester y su hermana Laura, David, Andrea, Irene, Juanelo, Zoraya, Juaco, María, Mario de Madarcos y Mario de Dinamarca, Popu, Rubén, Jorje, Vita, Nur... A la gente de La Nao: A Silvia, Lucía, Ana, a Álvaro, a Fer.

A mis amigos de Hoyo: A Juaco, a Raúl, Miguel y Elba, Andrés, Marisol, Juande, Silvia, Timy y Cibeles, Marina, Leti, Blanca, Celia, Emma, los dos Pablos, Julito y compañía.

A mis amigos de Cercedilla: A Belén, Rocío, Caroline, Cathy, Pablo y Fernanda, por aquellos años tan llenos de futuro y de proyectos. Y por los que vendrán...

A la gente del Escenas: A Candela, Olalla y Heini. A la gente de Ecologistas en Acción: a Tamara, Natalia y Mónica. A Blanca y Paola, compañeras de doctorado en otras áreas. A Agnes, tan lejos y tan cerca. A Ester y su gente, a Barsaah y su gente.

A todos mis compañeros del Conservatorio Profesional de Majadahonda, la gente de los cursos de música en Gredos, en Llanes, en Lucena, en Burgos, y a la gente de Salamanca. Nuestros caminos se separaron, pero siempre seré de los vuestros.

A la gente de la Almadraba, en el Cabo de Gata, por seguir allí año tras año, recordándonos que hay cosas que nunca deberían cambiar, como el vuelo diario de los flamencos sobre el mar al ponerse el sol.

A mi familia. A mis padres, que me enseñaron a leer y llenaron la casa de libros, que nos enseñaron a hacernos preguntas, a amar, a criticar, a soñar y a crear, y a vivir cerca de la tierra. A luchar por un mundo mejor donde las injusticias fueran cosa del pasado y todas las personas viviesen con dignidad. A mi hermana, por todas las excursiones, vías de escalada y recorridos con la bicicleta de montaña juntos. A mis primas Itzi y Laura.